



HAL
open science

Modulation et ciblage du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) dans le carcinome à cellules rénales post-transplantation

Sandra Bodeau

► **To cite this version:**

Sandra Bodeau. Modulation et ciblage du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) dans le carcinome à cellules rénales post-transplantation. Sciences agricoles. Université de Picardie Jules Verne, 2017. Français. NNT : 2017AMIE0021 . tel-03650854

HAL Id: tel-03650854

<https://theses.hal.science/tel-03650854>

Submitted on 25 Apr 2022

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.

Thèse de Doctorat

Mention : Biologie-Santé

Spécialité : Physiopathologie Humaine - Approches pharmacologiques des cancers

présenté à *l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)*

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Sandra BODEAU

pour l'obtention du grade de Docteur de l'université de Picardie Jules Verne

*Modulation et ciblage du facteur de croissance de
l'endothélium vasculaire (VEGF) dans le carcinome à
cellules rénales post-transplantation*

Soutenue le 13 juin 2017, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. P. Marquet, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Rapporteur

M. O. Pluquet, Maître de Conférences Universitaire

Rapporteur

M. B. Chauffert, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Examineur

M. A. Galmiche, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Examineur

M. M. Hazzan, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Examineur

M. G. Choukroun, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Directeur de Thèse

A Etienne, ma famille, mes amis...

Remerciements

A Monsieur le Professeur Gabriel Choukroun

Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée au cours de ce travail. Vos qualités d'écoute, d'ouverture et vos compétences m'ont permis d'évoluer et d'acquérir un savoir-faire qui sera utile dans la suite de mon travail.

A Monsieur le Professeur Antoine Galmiche

Je te remercie pour ton aide précieuse au cours de ces trois années de Doctorat. Merci de m'avoir fait partager tes compétences et ta passion pour la recherche ; j'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci également pour ta disponibilité.

A Monsieur le Professeur Pierre Marquet

Je suis très honorée par votre présence dans ce jury de Thèse, qui a débuté après une année passée au sein de votre unité de recherche. Votre expertise dans le domaine de la transplantation et de la pharmacologie des immunosuppresseurs sera très enrichissante pour nous. Merci d'avoir accepté de rapporter ce travail de Thèse.

A Monsieur le Docteur Olivier Pluquet

Je vous remercie vivement de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail en acceptant d'être rapporteur. Votre avis et vos compétences dans le domaine de l'UPR et des cancers comptent beaucoup pour nous.

A Monsieur le Professeur Marc Hazzan

C'est un honneur que vous me faites de participer à ce jury de Thèse et d'apporter votre regard d'expert sur ce travail.

A Monsieur le Professeur Bruno Chauffert

Je suis très reconnaissante que vous ayez accepté de faire partie de ce jury de Thèse. Je suis sensible à l'intérêt que vous porterez à ce travail.

A l'ensemble du personnel de l'unité INSERM 1088

Monsieur le Professeur Saïd Kamel,

Merci de m'avoir accueillie au sein de votre unité. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée dans ce travail.

Je remercie également les membres de l'unité pour leurs conseils ou les échanges que nous avons pu avoir ensemble.

A l'ensemble du personnel de l'EA4666

Christophe, Corinne,

Je vous remercie de votre bienveillance ; vous savez transmettre votre savoir-faire avec pédagogie et bonne humeur. C'est toujours un plaisir de travailler avec vous.

Chloé,

Je te remercie pour ton soutien et tes conseils.

Zuzana,

Je te remercie pour tes nombreuses relectures d'article qui ont été une aide précieuse dans ce travail.

A l'ensemble du personnel du laboratoire de Pharmacologie - Toxicologie du CHU d'Amiens

Monsieur le Docteur Kamel Masmoudi,

Je vous remercie pour votre soutien et pour votre confiance.

A mes collègues, Anne-Sophie et Youssef et à Charlotte,

J'apprécie la qualité de nos échanges tant sur le plan intellectuel que sur le plan humain.

Bénédicte, Charlotte, Chloé, Claudie, Delphine, Evelyne, Ludo, Ludovic et Marc,

Je suis ravie de travailler à vos côtés.

Je remercie également sans exception chaque membre du service de pharmacologie clinique et du centre régional de pharmacovigilance.

Résumé

Au cours de ces dernières décennies, les complications néoplasiques sont devenues l'une des 3 principales causes de décès chez les patients transplantés. Bien que la progression des complications néoplasiques soit complexe et d'origine multifactorielle, elle semble étroitement liée à l'utilisation au long cours de certains médicaments immunosuppresseurs tels que les inhibiteurs de la calcineurine (ICN), représentés par la ciclosporine (CsA) et le tacrolimus. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'exposition aux ICN sur la signalisation angiogénique dans le carcinome à cellules rénales (renal cell carcinoma – RCC) qui représente la deuxième cause de cancer chez les patients transplantés. Nous avons examiné *in vitro* l'impact de l'exposition aux ICN sur la réponse UPR (Unfolded Protein Response) et la régulation des protéines sécrétées en portant un intérêt particulier à la régulation du VEGF (Vascular Endothelial Growth factor). Dans ce contexte, nous confirmons l'effet de la CsA sur la protéostase et montrons que l'activation de l'UPR par la CsA, conduisant à une augmentation de la production de VEGF en hypoxie, pourrait participer à l'agressivité des tumeurs. Nous proposons de rechercher certains biomarqueurs de l'UPR (GRP78/BIP, cyclophiline B, ERp57, calréticuline, VEGF, angiogénine) chez les patients transplantés ayant développé un RCC afin d'examiner de façon plus approfondie l'altération de la protéostase et la régulation de l'UPR et d'évaluer leurs utilisations dans le dépistage et le suivi du RCC post-transplantation. Dans le domaine de la médecine personnalisée, d'autres approches comme la pharmacogénétique sont désormais utilisées dans la pratique médicale. Dans ce contexte, nous avons évalué l'intérêt du génotypage du *VEGF* dans une cohorte de patients transplantés rénaux. Nous montrons que le polymorphisme *VEGF* 936 C>T est associé de façon significative au risque de développer un RCC post-transplantation. Même s'il est évident que des études supplémentaires doivent être menées, nos résultats indiquent que les génotypes de *VEGF* 936 C>T pourraient être intéressants pour classer les patients en fonction du risque de développer un RCC post-transplantation afin d'améliorer le dépistage et la gestion des traitements immunosuppresseurs.

Mots clés : RCC post-transplantation ; VEGF ; UPR ; Ciclosporine ; polymorphismes génétiques.

Table des matières

Introduction générale.....	10
Chapitre I : Introduction.....	12
I. Problématique des complications néoplasiques post-transplantation.....	13
I.1. Généralité et contexte.....	13
I.2. Epidémiologie du RCC et caractéristiques du RCC post-transplantation.....	16
I.3. Mécanismes physiopathologiques du RCC et implication de la signalisation angiogénique.....	19
II. Principaux mécanismes cellulaires impliqués dans la progression des cancers post-transplantation : rôle des inhibiteurs de la calcineurine.....	32
II.1. Mode d'action pharmacologique des inhibiteurs de la calcineurine.....	32
II.2. Réparation de l'ADN.....	34
II.3. Modulation de l'expression du TGF- β	34
II.4. Stress oxydant.....	35
II.5. Modulation de l'expression du VEGF.....	35
II.6. Stress du réticulum endoplasmique et réponse UPR (unfolded protein response).....	37
III. Polymorphismes du <i>VEGF</i> et RCC.....	50
III.1. Association entre les polymorphismes du <i>VEGF</i> et le risque de RCC.....	52
III.2. Association entre les polymorphismes du <i>VEGF</i> et l'agressivité des cancers.....	57
III.3. Association entre les polymorphismes des <i>VEGFR</i> et la survie des patients.....	58
III.4. Intérêt des polymorphismes du <i>VEGF</i> et des <i>VEGFR</i> dans la population transplantée.....	61
IV. Hypothèses de travail et objectifs.....	62
Chapitre II : Travaux personnels.....	63
I. Article 1 : Intérêt du ciblage de l'UPR dans le RCC post-transplantation.....	64
II. Article 2 : Recherche de nouveaux biomarqueurs de l'UPR dans les cancers post-transplantation.....	74
III. Article 3 : Etude de l'association entre les polymorphismes du <i>VEGF</i> et des <i>VEGFR</i> et le risque de RCC post-transplantation : étude cas/témoin dans une cohorte de patients transplantés rénaux.....	93
Chapitre III : Discussion générale et conclusions.....	118
Chapitre IV : Références bibliographiques.....	129

Table des illustrations

Figure 1 : Régulation du facteur de transcription HIF (hypoxia inducible factor) en normoxie et en hypoxie (Gossage et al., 2015)	19
Figure 2 : Fixation des isoformes du VEGF aux récepteurs VEGFR1 (FLT1), VEGFR2 (KDR) et VEGFR3 (FLT4) (Ellis and Hicklin, 2008)	25
Figure 3 : Fonctions du VEGF (Goel and Mercurio, 2013)	27
Figure 4 : Principales voies de transduction du VEGF (Cross et al., 2003).....	28
Figure 5 : Représentation simplifiée des voies de signalisation impliquées dans le développement du RCC métastatique avec les cibles relatives des agents actuellement utilisés dans le traitement de ce cancer (Porta et al., 2017).....	30
Figure 6 : Mécanisme d'action des ICN (Samaniego et al., 2006)	33
Figure 7 : Représentation schématique de l'UPR (Urta et al., 2016).....	38
Figure 8 : UPR et événements impliqués dans la progression tumorale (Urta et al., 2016)	41
Figure 9 : UPR et angiogenèse (Dufey et al., 2015)	43
Figure 10 : Les cyclophilines et la régulation du repliement des protéines (Bodeau et al., Clinical Science)	45
Figure 11 : Position relatives des principaux SNP dans le <i>VEGF</i> (Jain et al., 2009).....	50
Tableau I : Classification des stades d'évolution de la maladie rénale chronique.....	13
Tableau II : Présentation des principaux médicaments immunosuppresseurs	14
Tableau III : Grade nucléaire de Fuhrman	17
Tableau IV : Répartition des types histologiques selon les populations observées	18
Tableau V : Principales mutations identifiées dans le ccRCC	22
Tableau VI : Caractéristiques des principaux SNP du <i>VEGF</i> étudiés dans le RCC	53
Tableau VII : Caractéristiques des principaux SNP des récepteurs <i>KDR</i> et <i>FLT4</i> étudiés dans le RCC	59

Liste des principales abréviations

ATF4, -6:	Activated transcription factor-4, -6
ARE:	AU rich element
<i>BAP1</i> :	<i>BRCA1-associated protein 1</i>
BIP/GRP78:	Immunoglobulin binding protein/Glucose related protein 78
CsA:	Ciclosporine
ccRCC:	clear cell Renal Cell Carcinoma
EBV:	virus d'Epstein-Barr
eIF2 α :	eukaryotic Initiation factor 2 α
ELB et ELC:	Elongines B et C
ERAD:	ER-associated degradation
FKBP:	FK506-binding protein
FLT1,-4:	Fms-related tyrosine kinase 1, -4
GRP94:	Glucose related protein 94
HIF:	Hypoxia Inducible Factor
HPV:	Human papillomavirus
HRE:	Hypoxic Response Element
ICN:	Inhibiteurs de la calcineurine
ITK:	Inhibiteurs de tyrosine kinase
IL-2:	Interleukine-2
IRE1- α :	Inositol requiring enzyme-1 α
IRES:	Internal ribosome entry segment
KDR:	Kinase insert domain receptor
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
miR:	miRNA
MPTP:	Mitochondrial permeability transition pore
mTOR:	mammalian Target of rapamycin
NFAT:	Nuclear factor of activated T-cells
NRF2:	Nuclear factor erythroid-2-related factor 2

NRP:	Neuropilines
PD-1:	Programmed death-1
PERK:	Protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase
PIGF:	Placental growth factor
PPIase:	Peptidyl-prolyl cis-trans isomérase
<i>PRBM1:</i>	<i>Polybromo 1</i>
pRCC:	papillary Renal Cell Carcinoma
RE:	Réticulum endoplasmique
RTK:	Récepteurs tyrosine kinase
<i>SETD2:</i>	<i>SET domain-containing 2</i>
SNP:	Single nucleotide polymorphisms
Sp1:	Specificity protein 1
TGF:	Transforming growth factor
UPR:	Unfolded Protein Response
UTR:	Untranslated region
VHL:	von Hippel Lindau
VCB:	von Hippel-Lindau-élongines B et C
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
VEGFR:	Vascular endothelial growth factor receptors
XBP1:	X-box binding protein 1

Introduction générale

Les progrès majeurs réalisés en transplantation rénale au cours de ces dernières décennies sont indissociables de l'évolution des médicaments immunosuppresseurs sur cette même période. La découverte et l'utilisation de la ciclosporine (CsA) au début des années 1980, puis du tacrolimus dans les années 1990, ont permis de diminuer fortement l'incidence du rejet aigu de greffe et d'améliorer la survie des patients. Cependant, l'augmentation de la survie des patients est contrebalancée par un risque accru de développer des complications néoplasiques qui représentent une cause importante de décès chez les patients transplantés. La progression des complications néoplasiques est étroitement liée à l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs au long cours et à la diminution des capacités du système immunitaire à éliminer les cellules tumorales de l'organisme. De plus en plus d'études pointent également le rôle déterminant du type d'immunosuppresseur utilisé. L'utilisation des inhibiteurs de calcineurine (ICN), représentés par la CsA et le tacrolimus, pourrait ainsi favoriser la progression tumorale par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes indépendants de leur effet sur le système immunitaire. Les cancers apparaissent désormais comme un des enjeux majeurs en transplantation. Dans ce contexte, plusieurs problématiques ont émergé : la compréhension des mécanismes moléculaires conduisant à la progression des cancers post-transplantation ; la recherche de nouveaux biomarqueurs qui permettraient d'améliorer leur dépistage et leur suivi ; et le développement de nouveaux outils de personnalisation des traitements immunosuppresseurs. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à ces problématiques dans le contexte du carcinome à cellules rénales (renal cell carcinoma – RCC) qui représente la deuxième cause de cancer chez les patients transplantés. Le développement et la progression du RCC étant étroitement liés à la régulation du VEGF (vascular endothelial growth factor), un facteur de croissance crucial dans l'angiogenèse, nous avons étudié la modulation de la signalisation angiogénique en nous focalisant sur de nouveaux aspects de la

régulation du VEGF. Dans ce domaine, l'activation de la réponse UPR (Unfolded Protein Response), de plus en plus étudiée actuellement dans les cancers et impliquée dans la régulation du VEGF, n'a pas été examinée dans les cancers post-transplantation. Nous avons ainsi étudié *in vitro* l'impact de l'exposition à la CsA sur la réponse UPR et la régulation des protéines sécrétées en portant un intérêt particulier à la régulation du VEGF. L'identification de mécanismes moléculaires spécifiques aux patients transplantés permettrait d'envisager des applications dans le domaine du ciblage thérapeutique ou de sélectionner de nouveaux biomarqueurs. Dans le domaine de la médecine personnalisée, d'autres approches comme la pharmacogénétique sont désormais utilisées dans la pratique médicale. Dans ce contexte, nous avons évalué l'intérêt du génotypage du *VEGF* dans une cohorte de patients transplantés rénaux. Ce type d'approche pourrait être envisagé pour adapter le traitement immunosuppresseur en fonction du risque de développer un cancer.

Chapitre I : Introduction

I. Problématique des complications néoplasiques post-transplantation

I.1. Généralité et contexte

La maladie rénale chronique (MRC) est définie par la présence de marqueurs d'atteinte rénale (tels que l'albuminurie) ou par une altération de la fonction rénale (évaluée par la baisse du débit de filtration glomérulaire [DFG]) pendant au minimum 3 mois (Levey and Coresh, 2012). Plusieurs stades ont été définis, selon le DFG, afin d'évaluer la gravité de la MRC (tableau I).

Tableau I : Classification des stades d'évolution de la maladie rénale chronique

Stade	DFG (mL/min/1,73m²)	Définition
1	≥ 90	MRC avec DFG normal ou augmenté (présence de marqueurs d'atteinte rénale)
2	60 à 89	MRC avec DFG légèrement diminué (présence de marqueurs d'atteinte rénale)
3	3A : 45 à 59 3B : 30 à 44	Insuffisance rénale chronique (IRC) modérée
4	15 à 29	IRC sévère
5	< 15	IRC terminale

L'insuffisance rénale est considérée comme la complication la plus grave de la MRC. Sa symptomatologie est étroitement liée à la diminution progressive des fonctions d'épuration et de maintien de l'homéostasie du rein. Au stade ultime, appelé IRC terminale, la gravité des symptômes impose la mise en œuvre d'un traitement de suppléance par hémodialyse ou dialyse péritonéale. A ce stade, certains patients dialysés peuvent bénéficier d'une transplantation qui représente actuellement le traitement de choix de l'IRC terminale car elle améliore la qualité de vie et la survie des patients par rapport à la dialyse (Halloran, 2004). Les progrès majeurs réalisés en transplantation rénale au cours de ces dernières décennies sont indissociables de l'évolution des traitements immunosuppresseurs sur cette même période (Knoll, 2008). Ainsi, l'utilisation des inhibiteurs de la calcineurine (ICN) représentés par la

ciclosporine (CsA) et le tacrolimus (découverts respectivement au début des années 1980 et dans les années 1990) a permis de diminuer fortement l'incidence du rejet aigu de greffe (Knoll, 2008). Désormais, d'autres classes de médicaments immunosuppresseurs sont disponibles et peuvent être utilisées en association avec les ICN en traitement d'induction dans le post-greffe immédiat ou en traitement d'entretien (**tableau II**).

Tableau II : Présentation des principaux médicaments immunosuppresseurs

Classe – définie par le mode d'action	Molécule	Nom de spécialité	Cible	Effet
Inhibiteurs de la calcineurine	Ciclosporine	Néoral [®] , Sandimmun [®]	Calcineurine	Inhibiteurs de l'activation lymphocytaire
	Tacrolimus	Prograf [®] , Advagraf [®]		
Inhibiteur de la costimulation	Belatacept	Nulojix [®]	CD80, CD86	Inhibiteur du co-signal d'activation lymphocytaire
Inhibiteurs de mTOR	Sirolimus	Rapamune [®]	mTOR	
	Évérolimus	Certican [®]		
Antimétabolites	Mycophénolate	CellCept [®] , Myfortic [®]	IMPDH	Inhibiteurs de la prolifération lymphocytaire
	Azathioprine	Imurel [®]	Biosynthèse des acides nucléiques	
Ac monoclonal anti-CD25	Basiliximab	Simulect [®]	CD25 (chaîne α du récepteur de l'IL-2)	
Ac polyclonaux anti-lymphocytaires	Immoglobulines de lapin anti-thymocytes humains	Thymoglobuline [®]	Ac polyclonaux	Déplétants T
Ac monoclonal anti-CD52	Alemtuzumab	Campath [®] , Lemtrada [®]	CD52	Déplétant T et B

Cependant, l'augmentation de la survie des patients transplantés est contrebalancée par l'émergence de complications néoplasiques liées à l'utilisation des traitements immunosuppresseurs au long cours. Après la première année de greffe, les infections étant mieux maîtrisées, les décès d'origine néoplasique représentent désormais la deuxième cause de décès après les décès d'origine cardiovasculaire (Chapman et al., 2013). Ainsi, 10 à 30% des décès sont attribués à des complications néoplasiques chez les patients transplantés (Geissler, 2015). La prise en compte de ce problème a conduit à la réalisation d'études basées

sur l'analyse de registres nationaux et internationaux de patients transplantés (Chapman et al., 2013; Engels et al., 2011; Geissler, 2015; Wong and Chapman, 2008). Ces études soulignent que, dans la population transplantée, le risque global de cancer est multiplié par un facteur 3 à 5 par rapport à la population générale après appariement sur l'âge et le sexe (Wong and Chapman, 2008). Ces études pointent également une épidémiologie particulière des cancers dans ce contexte. Ainsi, de façon intéressante, l'incidence de certains cancers fréquemment observés dans la population générale (comme le cancer du sein ou le cancer de la prostate) n'est pas augmentée. En revanche, certains cancers rarement observés dans la population générale ont une incidence augmentée chez les patients transplantés (Chapman et al., 2013; Engels et al., 2011). C'est le cas du carcinome à cellules rénales (renal cell carcinoma - RCC) qui représente la deuxième cause de cancer chez le patient transplanté après les cancers cutanés et sera plus particulièrement étudié au cours de ce travail (Engels et al., 2011; Kasiske et al., 2004). Dans le contexte de la transplantation, la diminution des capacités du système immunitaire à contrôler la répllication de certains virus à potentiel oncogène, tels que le virus d'Epstein-Barr (EBV) ou les papillomavirus humain (HPV), est un élément important qui peut expliquer l'augmentation de l'incidence de certaines tumeurs viro-induites (Engels et al., 2011). Ainsi, l'incidence des cancers cutanés (associés aux infections par HPV), des lymphomes non-hodgkinien (EBV) ou du sarcome de kaposi (Human Herpes Virus 8) est beaucoup plus élevée chez les patients transplantés comparativement à la population générale (Chapman et al., 2013; Engels et al., 2011). Chez les patients transplantés, l'augmentation du risque de complications néoplasiques est également étroitement liée à la diminution des capacités du système immunitaire dans son rôle de surveillance des cellules tumorales. Ceci est souligné par l'agressivité des cancers qui apparaissent dans un contexte d'immunosuppression chronique. Ainsi, malgré le suivi régulier recommandé dans cette population à risque, les cancers sont souvent diagnostiqués à un stade plus avancé et la survie

des patients transplantés développant un cancer est plus faible que celle dans la population générale pour un même cancer (Geissler, 2015). Plusieurs facteurs de risque liés aux patients, tels que l'âge, le sexe, le délai post-transplantation, les antécédents de cancer, l'origine ethnique ou le tabagisme, ont également été relevés dans plusieurs études (Chapman et al., 2013; Geissler, 2015). Parmi ces facteurs de risque, l'âge du patient est un paramètre important à considérer. Ainsi, les patients les plus à risque de développer des cancers sont les patients les plus jeunes. On considère qu'un patient jeune (âgé de moins de 30 ans) présente un risque de développer un cancer comparable à celui d'une personne âgée de 20 à 30 ans de plus que lui (Webster et al., 2007). Le risque reste augmenté pour les patients âgés de 30 à 65 ans. Au-delà de 65 ans, le risque redevient comparable à celui observé dans la population générale. En dehors de ces facteurs de risque, le type d'immunosuppresseur utilisé est très probablement un déterminant majeur du risque de cancer post-transplantation (Chapman et al., 2013; Geissler, 2015). Dans notre étude, nous examinons plus particulièrement le problème du RCC post-transplantation dont l'incidence est multipliée par un facteur 15 dans le contexte d'une exposition chronique aux traitements immunosuppresseurs (Kasiske et al., 2004).

I.2. Epidémiologie du RCC et caractéristiques du RCC post-transplantation

Dans la population générale, le cancer du rein se situe au septième rang des tumeurs solides de l'adulte avec une incidence de 11573 nouveaux cas estimés en France en 2012 (Rébillard et al., 2013). Le RCC représente 90% des tumeurs malignes du rein (Escudier et al., 2016). Il comprend deux types histologiques principaux : le RCC à cellules claires (ccRCC) et le RCC de type papillaire (pRCC) qui sont observés respectivement dans 70-80% et dans 10-15% des cas de RCC (Escudier et al., 2016). Les autres types de RCC sont nombreux mais ne

représentent qu'une faible proportion des tumeurs rénales et ne seront pas abordés dans ce travail. Dans le ccRCC et le pRCC, l'agressivité des tumeurs peut être évaluée grâce au grade nucléaire de Fuhrman corrélé à la survie des patients. Les grades de Fuhrman sont définis selon les caractéristiques morphologiques des noyaux des cellules tumorales. Cette classification comprend 4 grades histo-pronostiques d'agressivité croissante (tableau III) (Bretheau et al., 1995; Fuhrman et al., 1982).

Tableau III : Grade nucléaire de Fuhrman

Grade de Fuhrman	Caractéristiques histologiques	Survie à 5 ans	Risque de survenue de métastases
I	Petits noyaux ronds (10 µm), contours réguliers, pas de nucléoles	76%	2%
II	Noyaux plus volumineux (15 µm), légèrement irréguliers	72%	9%
III	Noyaux volumineux (20 µm), contours très irréguliers	51%	17%
IV	Critères identiques au grade III et présence de cellules monstrueuses	43%	30%

Chez les patients transplantés rénaux, le risque de développer un RCC est multiplié par 15 par rapport à la population générale de même âge et de même sexe (Kasiske et al., 2004). Le RCC se développe le plus souvent sur le rein natif. L'incidence des cancers du greffon n'ayant été rapportée qu'à 0,19% des tumeurs rénales diagnostiquées *de novo* chez les transplantés rénaux (Tillou et al., 2012), nous n'aborderons que le cas du RCC du rein natif. Chez les patients transplantés, les 2 types de RCC les plus souvent diagnostiqués restent le ccRCC et le pRCC mais les proportions diffèrent par rapport à la population générale (Tillou et al., 2012). Chez ces patients, le ccRCC survient ainsi dans 50 à 60% des cas de RCC et le pRCC, plus souvent diagnostiqué, représente 30 à 45% des cas de RCC (Gigante et al., 2012; Lee et al., 2012; Moon et al., 2015). Cette répartition est plus proche de celle survenant chez les patients dialysés (Gigante et al., 2012) (tableau IV).

Tableau IV : Répartition des types histologiques selon les populations observées

Population générale		Patients dialysés				Patients transplantés rénaux				
	(Znaor et al., 2015)	(Neuzillet et al., 2011)	(Neuzillet et al., 2011)	(Lee et al., 2012)	(Gigante et al., 2012)	(Takagi et al., 2017)	(Moon et al., 2015)	(Lee et al., 2012)	(Takagi et al., 2017)	(Gigante et al., 2012)
ccRCC	70%	89%	59%	64%	77%	77%	50%	57%	67%	50%
pRCC	10-15%	7%	37%	27%	22%	21%	44%	29%	31%	44%

La plus grande proximité de la répartition des types histologiques entre les patients transplantés et les patients dialysés souligne le rôle probable de la pathologie rénale pré-existante et de l'ancienneté de l'évolution de la MRC. Il existe toutefois des différences entre ces deux populations qui soulignent le rôle de l'immunosuppression chronique chez les patients transplantés. Ainsi, dans l'étude de Gigante *et al.*, qui ont comparé les caractéristiques des RCC dans une cohorte de 303 patients comprenant 233 patients transplantés et 90 patients dialysés, les patients transplantés avaient développé un RCC à un âge significativement plus jeune et le pRCC était plus souvent observé (44% contre 22% $p < 0.001$) (Gigante *et al.*, 2012). La taille de la tumeur et le nombre de métastases étaient significativement plus faibles chez les patients transplantés. Ceci doit être mis en relation avec un suivi régulier et notamment la réalisation d'imagerie des reins natifs permettant un diagnostic plus précoce chez ces patients.

Bien que des facteurs de risque spécifiques tels que la pathologie rénale pré-existante ou l'ancienneté de l'évolution de la maladie rénale chronique aient été identifiés, la signalisation angiogénique joue, comme dans la population générale, un rôle prépondérant dans le développement et la progression du RCC post-transplantation.

I.3. Mécanismes physiopathologiques du RCC et implication de la signalisation angiogénique

I.3.1. Physiopathologie du RCC

I.3.1.1. Mutation du gène suppresseur de tumeur VHL (Von Hippel Lindau)

Des mutations du gène suppresseur de tumeur *VHL* (von Hippel Lindau) ont été décrites dans près de 70% des cas sporadiques de ccRCC (Gnarra et al., 1994). Dans la plupart des cas, il s'agit de mutation non-sens, d'insertion ou de délétion conduisant à la perte de fonction de la protéine pVHL. En condition normoxique, la protéine pVHL forme un complexe stable appelé VCB (von Hippel-Lindau-élongines B et C) avec les élongines B et C (ELB et ELC). Le complexe VCB peut s'associer avec la protéine culline-2 (CUL2) et la protéine RBX1 (RING-box protein-1) pour former le complexe VCB-CR ayant une activité E3 ubiquitine ligase (figure 1).

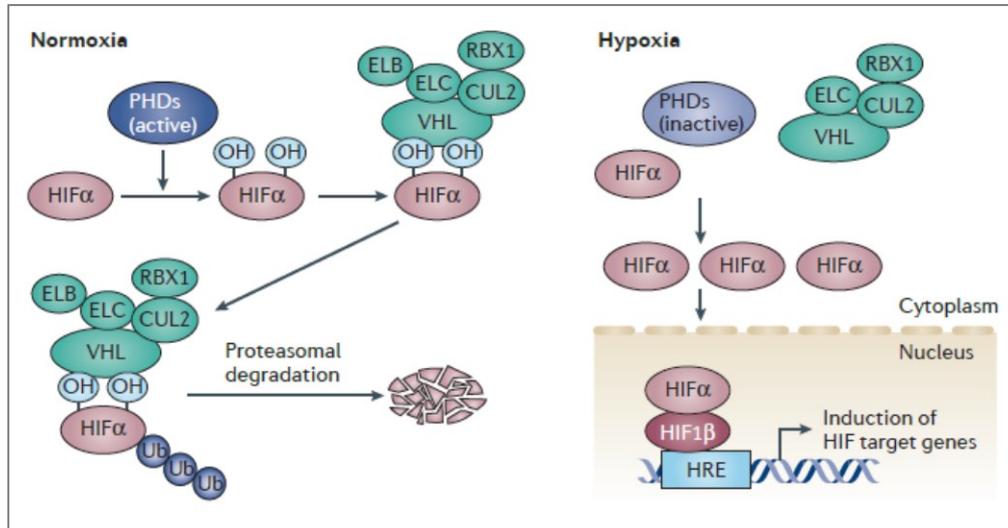


Figure 1 : Régulation du facteur de transcription HIF (hypoxia inducible factor) en normoxie et en hypoxie (Gossage et al., 2015)

Dans ces conditions, VCB-CR contrôle l'ubiquitylation et la dégradation du facteur de transcription HIFα (hypoxia inducible factor) par le protéasome (Cockman et al., 2000). La reconnaissance de HIFα par VCB-CR est assurée par l'interaction entre le domaine β de

pVHL et de courtes séquences très conservées au niveau de HIF α contenant deux résidus de proline hydroxylés (Sutter et al., 2000). L'hydroxylation des résidus de proline de HIF α , qui est assurée par la prolyl hydroxylase (PDH), ne peut avoir lieu qu'en normoxie. Il en résulte une diminution de l'ubiquitylation et de la dégradation de HIF α en condition hypoxique ou en cas de perte de fonction de pVHL. Une accumulation de HIF α et la formation d'hétérodimères avec HIF β sont alors observées. Après translocation dans le noyau, les hétérodimères HIF α/β se fixent aux séquences HRE (Hypoxic Response Element) et peuvent activer la transcription de gènes impliqués dans l'adaptation à l'hypoxie. Plus de 800 gènes ont été identifiés (Schödel et al., 2011; Xia et al., 2009). Parmi eux, l'activation de gènes critiques pour l'angiogenèse (Vascular endothelial growth factor – *VEGF*), pour la croissance cellulaire (Transforming growth factor α – *TGFA*), la capture du glucose (le transporteur du glucose - *GLUT1*) et la balance acido-basique (carbonic anhydrase IX – *CA9*) a été décrite. L'activation inappropriée de ces gènes en normoxie, induite par le dysfonctionnement de pVHL, et l'accumulation de HIF α contribue directement à la tumorigenèse rénale (Gossage et al., 2015). Les deux isoformes de HIF α , HIF1 α et HIF2 α , sont susceptibles de s'accumuler en hypoxie et d'activer la transcription des gènes HRE-dépendante. Il existe toutefois des différences entre HIF1 α et HIF2 α . D'une part, HIF1 α est ubiquitaire tandis que HIF2 α est uniquement exprimé au niveau des cellules endothéliales, rénales, hépatiques et pulmonaires (Gossage et al., 2015). D'autre part, bien que des différences aient été observées selon les types cellulaires, HIF1 α a été impliqué dans l'activation de voies apoptotiques tandis que HIF2 α a été associé à la croissance cellulaire et à l'angiogenèse (Hu et al., 2003; Raval et al., 2005). Dans le ccRCC, de plus en plus de données sont en faveur du rôle contributif de HIF2 α (Keith et al., 2011). HIF2 α paraît à la fois nécessaire et suffisant pour assurer la croissance *in vitro* et *in vivo* de lignées cellulaires de ccRCC déficientes en VHL (*VHL* -/-) (Zimmer et al., 2004). Dans l'étude de Gordan *et al.*, les tumeurs ont été classées en 3 groupes en fonction du

statut *VHL* et de l'expression de HIF1 α et de HIF2 α . Les tumeurs *VHL* -/- exprimant uniquement HIF2 α présentaient une augmentation de l'activité de *MYC* et une prolifération plus importante comparativement aux tumeurs *VHL* -/- exprimant HIF1 α et HIF2 α (Gordan et al., 2008). HIF2 α apparaît ainsi comme une cible intéressante qui pourrait faire l'objet de développements futurs dans le traitement du RCC.

L'accumulation de HIF α et l'activation inappropriée de gènes en normoxie liées à un dysfonctionnement de pVHL apparaissent comme des facteurs essentiels contribuant directement à la tumorigenèse rénale (Gossage et al., 2015). Ainsi, la réintroduction de pVHL dans des lignées cellulaires de ccRCC *VHL* -/- est suffisante pour diminuer la transcription de ces gènes en normoxie et inhiber la croissance tumorale *in vivo* (Zimmer et al., 2004). Récemment, la mise en évidence de mutations du gène *TCEB1*, codant pour l'élongine C, affectant la formation du complexe VCB a pointé l'importance du fonctionnement de ce complexe dans son ensemble dans le ccRCC (Sato et al., 2013).

1.3.1.2. Autres mutations identifiées dans le ccRCC

Jusqu'en 2010, les études fondamentales sur le ccRCC étaient focalisées sur *VHL*, HIF α et les gènes HRE induits. Des pertes alléliques récurrentes avaient été mises en évidence à différents loci du bras court du chromosome 3 : 3p12, 3p13-14.2, 3p21 et 3p25-26. Dans des études de séquençage récentes, d'autres gènes impliqués dans le développement du ccRCC ont désormais été identifiés sur le chromosome 3p. Il s'agit de gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine tels que *PRBMI* (polybromo 1 – mutation dans 41% des ccRCC), *BAP1* (BRCA1-associated protein 1 – mutation dans 8-11 % des ccRCC) et *SETD2* (SET domain-containing 2 – mutation dans 3-12% des ccRCC) (Brugarolas, 2014; Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Des mutations de gènes impliqués dans la régulation de la voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) (*MTOR*, *TSC1* (tuberous sclerosis 1), *PIK3CA*, *PTEN*) ont également été retrouvées dans 20% des ccRCC. Ces observations

soulignent l'importance de la voie PI3K/PKB-akt (phosphatidyl inositol-3-kinase/protein kinase B) dans la progression tumorale et soutiennent l'utilisation des inhibiteurs de mTOR dans le traitement du RCC. Les mutations les plus fréquemment observées dans le ccRCC sont regroupées dans le tableau V.

Tableau V : Principales mutations identifiées dans le ccRCC

Localisation	Gène	Proportion de tumeurs avec la mutation - cohorte TCGA*
3p25.3	<i>VHL</i>	52,3%
3p21.1	<i>PBRM1</i>	32,9%
3p21.1	<i>BAP1</i>	10,1%
3p21.31	<i>SETD2</i>	11,5%
1p36.22	<i>MTOR</i>	6%
3q26.32	<i>PIK3CA</i>	2,9%
10q23.31	<i>PTEN</i>	4,3%

*TCGA : The Cancer Genome Atlas - Données issues de l'étude de Creighton *et al.* (table S4) (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013) exploitées dans l'étude de Brugarolas *et al.* (Brugarolas, 2014).

Au sein d'une même tumeur, plusieurs clones arborant différentes mutations peuvent co-exister (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Certaines mutations, dites ubiquitaires, comme celles conduisant à l'inactivation de pVHL, sont partagées par l'ensemble des clones et sont suffisantes à elles-seules dans le développement du ccRCC. D'autres mutations ne sont partagées que par des sous-clones et contribuent à l'hétérogénéité de la tumeur et aux différences de réponse aux thérapies ciblées (Gossage *et al.*, 2015).

I.3.1.3. RCC de type papillaire (pRCC)

Dans les pRCC, deux sous-types histologiques principaux ont été décrits avec des variations importantes dans la progression de la maladie et le devenir des patients. Peu d'altérations génomiques ont actuellement été décrites dans les formes sporadiques de pRCC. Dans ce domaine, une grande partie des connaissances résulte de l'étude de formes héréditaires de la maladie. Des mutations de *MET* ont ainsi été décrites dans le carcinome héréditaire des cellules papillaires rénales, un trouble rare associé à un risque accru de pRCC de type 1. Dans le syndrome de léiomyomatose héréditaire, qui confère une prédisposition à une forme agressive de pRCC de type 2, une mutation du gène codant pour la fumarate hydratase (FH) a été observée. Ces tumeurs agressives sont caractérisées par un stress oxydatif accru et l'activation de la voie NRF2-ARE (nuclear factor erythroid-2-related factor 2 - antioxidant response element). Des mutations dans les gènes régulant cette voie, tels que *CUL3* et *NFE2L2* (codant pour NRF2), ont également été observées (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2016; Durinck et al., 2015). L'analyse génomique récente de 161 tumeurs papillaires de RCC a confirmé l'association de modifications de la voie MET avec le pRCC de type 1 et l'activation de la voie NRF2-ARE avec le pRCC de type 2. Dans le type 2, des mutations (telles que celles de *CDKN2A*) et des modifications épigénétiques (CpG island methylator phenotype ; CIMP) ont été associées à un mauvais pronostic (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2016). Ces avancées offrent de nouvelles perspectives dans le traitement du pRCC.

I.3.2. Vascular endothelial growth factor - VEGF

Initialement, le VEGF a été identifié comme étant un facteur de croissance capable d'induire l'angiogenèse physiologique et pathologique, stimulant la prolifération et la migration des cellules endothéliales, et augmentant la perméabilité vasculaire (Leung et al., 1989). Au-delà de ces fonctions, le VEGF exerce également une action sur la tumorigenèse, en maintenant le pool de cellules souches tumorales, et sur le microenvironnement tumoral (Senger, 2010). Il apparaît comme un facteur essentiel impliqué dans de nombreux cancers dont le RCC.

I.3.2.1. Caractéristiques, distribution, régulation

Il existe différents facteurs appartenant à la famille du VEGF : le VEGFA, le VEGFB, le VEGFC, le VEGFD et le PIGF (placental growth factor). Ils se différencient notamment par leur synthèse, leur interaction avec les récepteurs du VEGF (VEGFR) et leurs fonctions. La connaissance approfondie des différentes formes du VEGF a été essentielle dans le développement des thérapies ciblant cette voie de signalisation et utilisées dans le traitement du RCC. L'isoforme la plus répandue et la plus étudiée actuellement est le VEGFA. En fonction de l'épissage du pré-ARNm du *VEGFA*, on distingue différents variants du VEGFA comprenant 121-, 145-, 148-, 165-, 183-, 189- ou 206- acides aminés. Le VEGFA₁₆₅ est le variant prédominant, fréquemment surexprimé dans les tumeurs solides chez l'homme. Un autre variant, le VEGFA_{165b}, résultant de l'épissage différentiel de l'exon 8, a été plus récemment identifié par Bates *et al.* (Bates et al., 2002). Dans cette étude, l'expression de ce variant, ayant un effet inhibiteur sur l'angiogenèse, était significativement diminuée dans les tumeurs rénales comparativement au tissu sain (Bates et al., 2002). Plus généralement, comme pour le VEGFA₁₆₅, l'épissage alternatif de l'exon 8 de l'ARNm du *VEGFA* est susceptible de générer, pour chaque variant, 2 types de protéine ayant des propriétés pro- ou anti-angiogéniques (Harper and Bates, 2008). Les variants pro-angiogéniques (notés VEGFA_{xxx}, avec xxx le nombre d'acides aminés) sont générés par la sélection du site d'épissage proximal

dans l'exon 8. Les variants anti-angiogéniques (VEGF-A_{xxx}) résultent de la sélection du site d'épissage distal dans le même exon. Ainsi, l'équilibre entre les différentes isoformes du VEGFA apparait être un élément essentiel pour réguler l'angiogenèse dans son ensemble. La différence d'activité entre les variants pro- et anti-angiogéniques du VEGF-A résulte de la modification de seulement 6 acides aminés dans la partie carboxylique terminale ayant notamment des conséquences sur leurs interactions avec les VEGFR (Harper and Bates, 2008). Dans la suite de ce travail, nous nous intéressons uniquement aux isoformes pro-angiogéniques.

Il existe 3 types de récepteurs tyrosine kinase (RTK) pour le VEGF : VEGFR1 (FLT1 - Fms-related tyrosine kinase 1), VEGFR2 (KDR - Kinase insert domain receptor) et VEGFR3 (FLT4 - Fms-related tyrosine kinase 4). L'interaction de ces récepteurs avec les différentes isoformes du VEGF est résumée en figure 2.

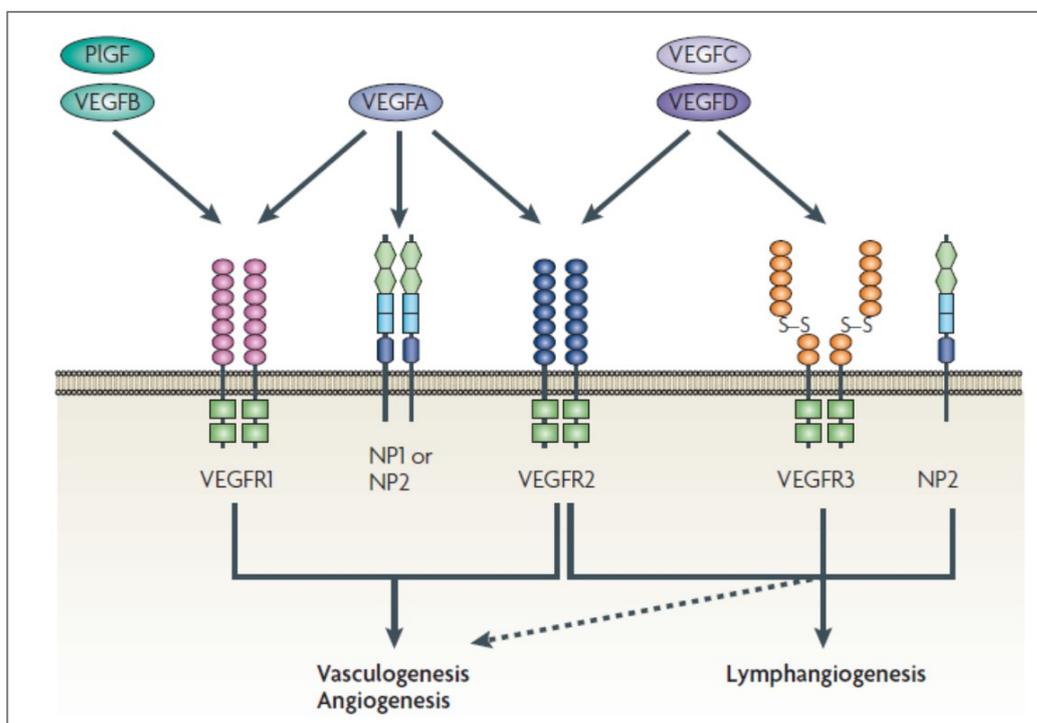


Figure 2 : Fixation des isoformes du VEGF aux récepteurs VEGFR1 (FLT1), VEGFR2 (KDR) et VEGFR3 (FLT4) (Ellis and Hicklin, 2008)

En résumé, le VEGFA se lie au VEGFR1 et au VEGFR2. Le VEGFB et le PlGF se lient exclusivement au VEGFR1 (Ellis and Hicklin, 2008). La répartition de ces récepteurs varie selon le type cellulaire. Ainsi, les VEGFR1-2 sont exprimés principalement sur les cellules endothéliales et les cellules tumorales. VEGFR2 est la cible principale du VEGF au niveau des cellules endothéliales. C'est la forme de récepteur principalement impliquée dans l'angiogenèse tumorale (Ellis and Hicklin, 2008). VEGFR2 a également été identifié sur les cellules cancéreuses rénales, ce qui le rend particulièrement intéressant dans le RCC (Goel and Mercurio, 2013). Le VEGFR3, qui fixe le VEGFC et le VEGFD, contribue à la lymphangiogenèse tumorale (Ellis and Hicklin, 2008).

Dans les cellules tumorales, l'activation des voies de signalisation du VEGF fait également intervenir d'autres récepteurs appelés neuropilines (NRP) (Prud'homme and Glinka, 2012). Les NRP (NRP1 et NRP2) paraissent avoir un rôle de cofacteur en potentialisant l'affinité du VEGF pour les VEGFR (VEGFR1 et VEGFR2) (Goel and Mercurio, 2013). Récemment, il a également été montré que les NRP étaient également capables de lier directement des facteurs de croissance dont le VEGF (Cao et al., 2012). Cette interaction semble jouer un rôle important dans l'action autocrine du VEGF (Goel and Mercurio, 2013).

1.3.2.2. Fonctions

Le VEGF intervient dans l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire, le renouvellement du pool de cellules souches tumorales. Il agit aussi sur le microenvironnement tumoral. Ces différentes actions, résumées en figure 3, sont indispensables à la progression tumorale (Goel and Mercurio, 2013).

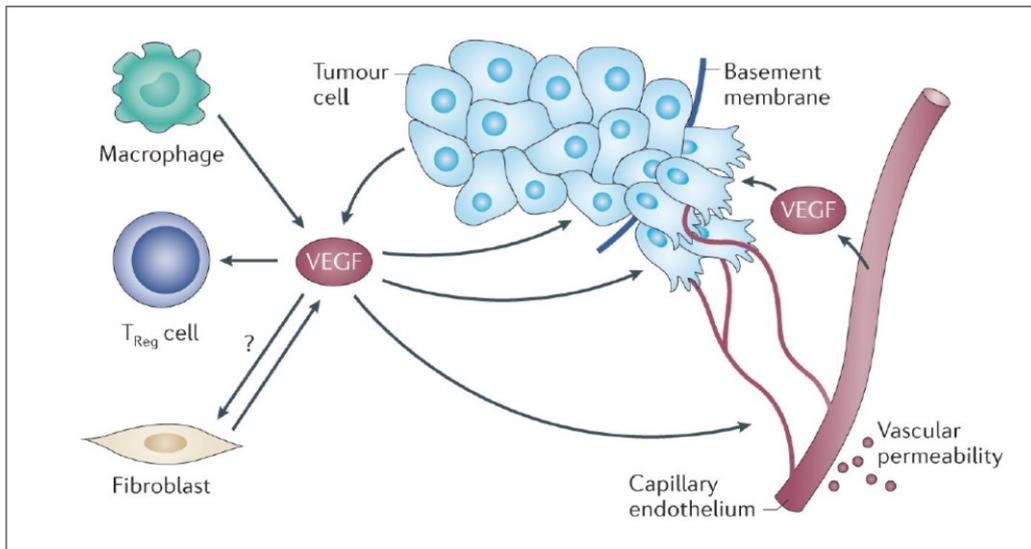


Figure 3 : Fonctions du VEGF (Goel and Mercurio, 2013)

i. Cellules endothéliales et angiogénèse tumorale

Le VEGF a une action paracrine sur les cellules endothéliales voisines permettant de stimuler l'angiogénèse tumorale. Cet effet, lié à une fixation du VEGF sur les récepteurs VEGFR2 (et, dans une moindre mesure VEGFR1) se manifeste par une stimulation de la prolifération des cellules endothéliales, une augmentation de leur capacité de migration et une hyperperméabilité des vaisseaux facilitant notamment la diffusion des cellules endothéliales et la migration des précurseurs des cellules endothéliales par chimiotactisme. L'activation de plusieurs voies de transduction (PI3K/AKT, RAS/RAF/MEK/ERK, p38MAPK) a été associée à ces effets au cours de ces dernières décennies (figure 4) (Cross et al., 2003).

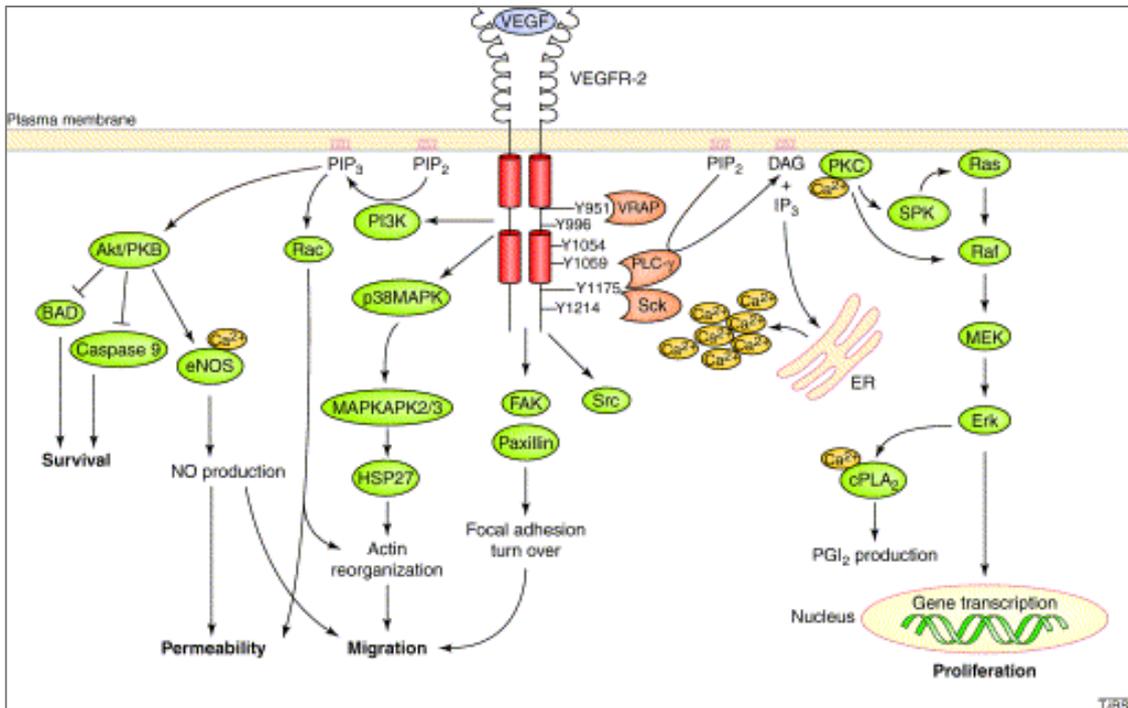


Figure 4 : Principales voies de transduction du VEGF (Cross et al., 2003)

Indépendamment de son effet sur les cellules endothéliales, le VEGF a d'autres fonctions importantes dans le processus d'initiation et de maintien de la croissance tumorale.

ii. VEGF, boucle autocrine et tumorigène

Au niveau de la tumeur, l'action autocrine du VEGF a été impliquée dans la croissance, la survie, la migration et la dissémination métastatique des cellules tumorales. Ces effets ont principalement été associés à la stimulation de la voie de signalisation PI3K/PKB-akt et de celle des MAPK (Mitogen-activated protein kinase). Récemment, le rôle des boucles autocrines a été mis en évidence dans l'auto-renouvellement des cellules souches tumorales et a été associé à l'agressivité des tumeurs (Beck et al., 2011). Dans ce contexte, les NRP ont un rôle central lié à leur effet sur la régulation de l'expression des RTK et des intégrines (Goel et al., 2012). Indépendamment de leur interaction avec les RTK, Cao *et al.* ont également montré que les NRP avaient un rôle dans l'activation des voies de signalisation du VEGF et l'initiation du RCC en l'absence de VEGFR (Cao et al., 2012). Bien que cette nouvelle

approche ne soit pas encore complètement élucidée, elle ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension du rôle du VEGF dans l'initiation et la progression tumorale. Compte tenu de l'importance des NRP dans la signalisation autocrine, des approches thérapeutiques ciblant les NRP (anticorps (Ac) anti-NRP) sont en cours d'évaluation. Dans ce contexte, des mécanismes de résistance impliquant l'activation d'autres voies de signalisation sont à envisager. Ainsi, Goel *et al.* ont mis en évidence une activation de l'IGFR1 (insulin growth factor receptor) et une prolifération des cellules tumorales prostatiques après l'inhibition de NRP2 (Goel et al., 2012).

iii. VEGF et microenvironnement

Au-delà de son action sur les cellules endothéliales et tumorales, le VEGF est capable d'agir sur d'autres types cellulaires présents dans le microenvironnement de la tumeur. L'action de certains types de cellules immunitaires sur la croissance tumorale peut ainsi être régulée par le VEGF via une fixation sur NRP1 (Hansen et al., 2012). Par ailleurs, il a été montré que les macrophages et les fibroblastes étaient capables de sécréter du VEGF dans le microenvironnement hypoxique de la tumeur (Goel and Mercurio, 2013).

1.3.2.3. Ciblage du VEGF en thérapeutique

Le rôle crucial du VEGF dans l'activation des boucles de signalisation autocrine et paracrine est également illustré par le développement croissant de molécules thérapeutiques ciblant le VEGF et les VEGFR. Ainsi, plusieurs approches thérapeutiques consistant à inhiber les voies de signalisation du VEGF peuvent désormais être mises en œuvre dans le traitement du RCC métastatique (figure 5) (Porta et al., 2017).

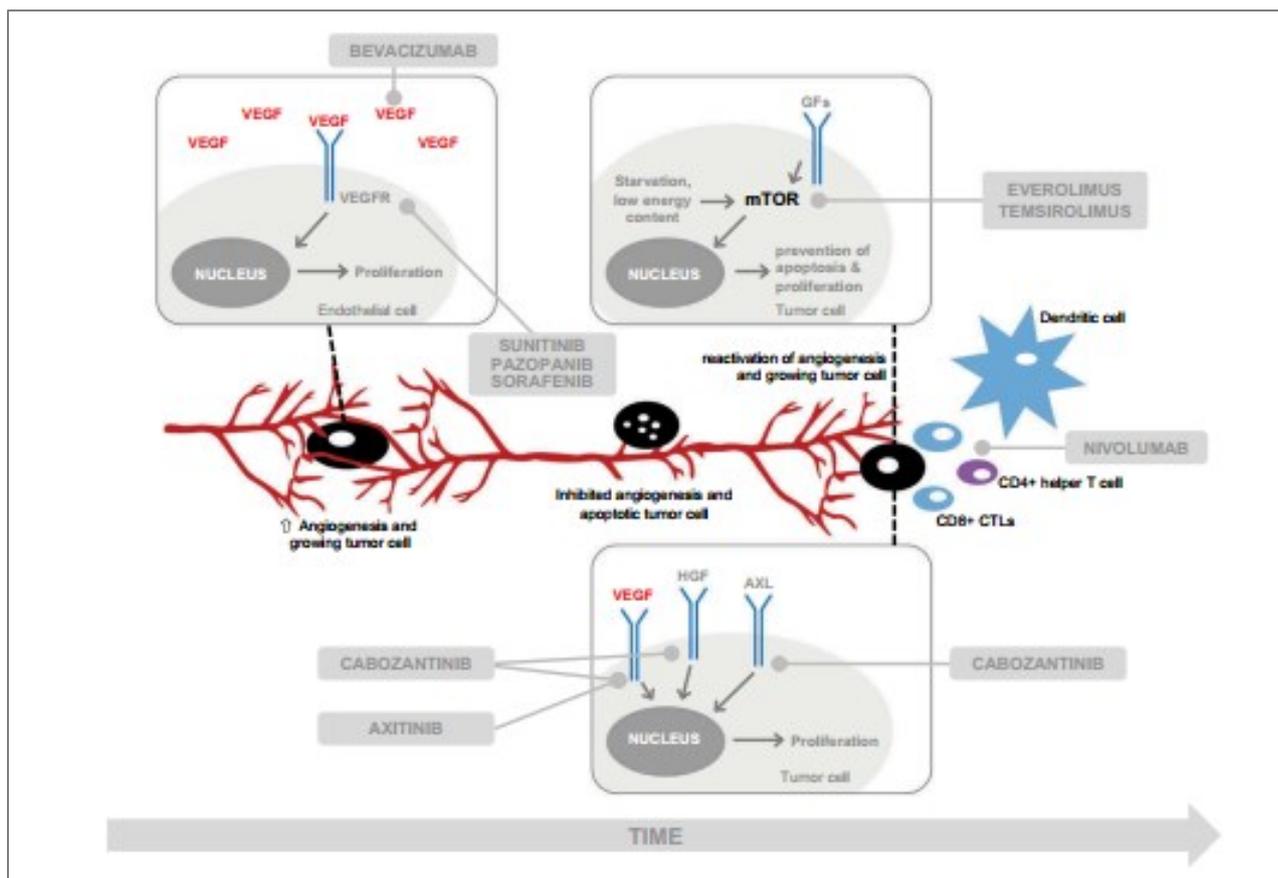


Figure 5 : Représentation simplifiée des voies de signalisation impliquées dans le développement du RCC métastatique avec les cibles relatives des agents actuellement utilisés dans le traitement de ce cancer (Porta et al., 2017).

Ces approches thérapeutiques peuvent reposer sur l'utilisation d'Ac humanisé ciblant le VEGF (bevacizumab – Avastin[®]) ou d'inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) ciblant le VEGFR de façon plus ou moins spécifique (sunitinib - Sutent[®], sorafénib - Nexavar[®], pazopanib-Votrient[®], Axitinib - Inlyta[®] ou Cabozantinib - Cometriq[®]). D'autres alternatives aux thérapies ciblant le VEGF peuvent également être proposées. Les inhibiteurs de mTOR (temsirolimus - Torisel[®] ou évérolimus - Affinitor[®]) peuvent être utilisés pour inhiber la prolifération des cellules tumorales en première ou en deuxième ligne de traitement du RCC métastatique. Récemment, une immunothérapie potentialisant les réponses antitumorales des lymphocytes T par un blocage de la liaison de PD-1 (programmed death-1) aux ligands PD-

L1 et PD-L2 a été développée et peut être proposée en deuxième ligne de traitement du RCC à un stade avancé (nivolumab – Opdivo[®]).

Dans le contexte de la transplantation rénale, la prise en charge du RCC diffère. En effet, le RCC est diagnostiqué dans la majorité des cas à un stade non métastatique sur un rein non fonctionnel. La néphrectomie est donc souvent envisagée en première intention (Tillou et al., 2012). En revanche, en cas de découverte à un stade métastatique ou en cas de récurrence, une thérapie ciblant le VEGF peut également être envisagée en complément de la néphrectomie. Dans tous les cas, la gestion du traitement immunosuppresseur doit faire l'objet d'une attention particulière. Plusieurs stratégies, telles qu'une diminution des posologies ou le changement de médicament immunosuppresseur des ICN vers les inhibiteurs de mTOR ayant des propriétés anti-angiogéniques et antiprolifératives, peuvent être envisagées en fonction du contexte clinique (Geissler, 2015; Holdaas et al., 2016).

L'examen de l'impact du traitement immunosuppresseur sur la progression des tumeurs rénales post-transplantation paraît primordial pour améliorer la compréhension de la physiopathologie du RCC post-transplantation et la gestion du traitement immunosuppresseur dans ce contexte.

II. Principaux mécanismes cellulaires impliqués dans la progression des cancers post-transplantation : rôle des inhibiteurs de la calcineurine

Plusieurs études biologiques et cliniques suggèrent que les ICN et, en particulier la CsA qui a été la pierre angulaire de la thérapie immunosuppressive au cours de ces dernières décennies, pourraient favoriser la progression tumorale indépendamment de leurs effets sur le système immunitaire (Basu et al., 2008, 2012; Datta et al., 2009; Euvrard et al., 2012; Hojo et al., 1999; Walsh et al., 2011; Zhou and Ryeom, 2014). Nous proposons ici une synthèse des principaux mécanismes cellulaires impliqués dans la progression tumorale au cours d'une exposition aux ICN. Nous porterons un intérêt particulier à l'implication de la réponse UPR (Unfolded Protein Response) qui a été peu étudiée dans le contexte des complications néoplasiques post-transplantation et sera examinée au cours de ce travail.

II.1. Mode d'action pharmacologique des inhibiteurs de la calcineurine

Les ICN sont représentés par la CsA et le tacrolimus. La découverte et l'utilisation de la CsA au début des années 1980, puis du tacrolimus dans les années 1990, ont permis de diminuer significativement l'incidence du rejet aigu du greffon (Meier-Kriesche et al., 2006). Bien qu'ayant des structures chimiques différentes, l'effet immunosuppresseur des ICN passe dans les deux cas par une inhibition de la production d'IL-2 (interleukine-2), indispensable à l'activation des lymphocytes T (figure 6).

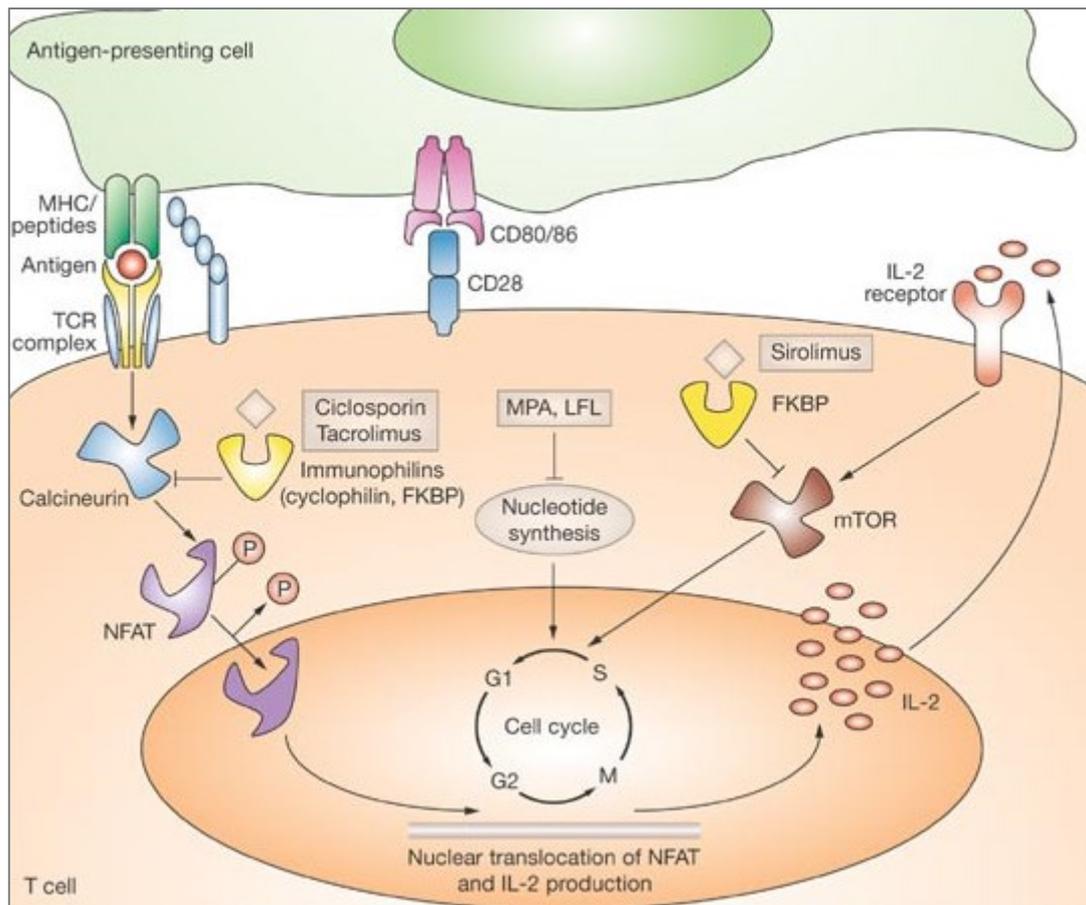


Figure 6 : Mécanisme d'action des ICN (Samaniego et al., 2006)

Une fois dans le cytoplasme du lymphocyte T, la CsA se lie à la cyclophiline A et le tacrolimus se lie au FKBP12 (FK506-binding protein) (Schreiber, 1991; Siekierka et al., 1989; Takahashi et al., 1989). Une fois ce complexe ICN-immunophiline formé, la CsA ou le tacrolimus se lie à la calcineurine, une protéine phosphatase cytoplasmique calcium- et calmoduline-dépendante impliquée dans la régulation de la transcription des cellules eucaryotes (Clipstone and Crabtree, 1992). Une fois inhibée par la CsA ou le tacrolimus, la calcineurine n'a plus la capacité à déphosphoryler NFAT (nuclear factor of activated T-cells). Ce facteur de transcription, resté à l'état phosphorylé, ne peut plus migrer dans le noyau et activer la transcription de l'IL-2 (Flanagan et al., 1991; Jain et al., 1993). Les effets autocrine de l'IL-2 sur les lymphocytes T et paracrine sur les cellules NK (Natural Killer) et les lymphocytes B activés sont ainsi inhibés. La transcription de gènes codant pour d'autres

interleukines impliquées dans la réponse immunitaire, telles que l'IL-3, l'IL-4, l'interféron- γ (IFN- γ) et le TNF- α , sont également inhibées.

II.2. Réparation de l'ADN

Plusieurs études ont mis en évidence une inhibition des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN par les ICN (Kuschal et al., 2012; Ori et al., 2012; Thoms et al., 2011). Ces effets ont essentiellement été démontrés dans des lignées d'adénocarcinome cutané et impliquaient une diminution du fonctionnement de l'ADN polymérase β (Ahlers et al., 1999). Une étude clinique ayant examiné l'impact des ICN chez des patients ayant développé des cancers cutanés post-transplantation a permis de confirmer cet effet (Herman et al., 2001). Cependant, aucun effet synergique lié à l'association des ICN à l'azathioprine, ayant un effet mutagène *in vitro*, n'avait été observé dans cette étude (Herman et al., 2001).

II.3. Modulation de l'expression du TGF- β

Hojo *et al.* ont montré que des cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain exposées *in vitro* à la CsA étaient capables d'acquies des modifications morphologiques et une augmentation de leur mobilité qui augmenteraient leur pouvoir invasif (Hojo et al., 1999). Ces modifications semblent liées à une augmentation de l'expression de TGF- β induite par la CsA. *In vivo*, la même équipe a montré que des souris immunodéprimées traitées par de la CsA développaient plus de métastases pulmonaires après injection de cellules d'adénocarcinome rénal d'origine murine. Le même effet a été montré avec le tacrolimus chez des souris immunodéprimées après inoculation de cellules d'adénocarcinome rénal (Maluccio et al., 2003).

II.4. Stress oxydant

La cyclophiline D est un membre de la famille des cyclophilines présente dans les mitochondries. À ce niveau, la cyclophiline D est capable d'inhiber le MPTP (mitochondrial permeability transition pore), un pore formé par l'apposition des membranes mitochondriales externes et internes typiquement observé *in vitro* lors de l'exposition de mitochondries purifiées à de fortes concentrations d'ions Ca^{2+} (Nakagawa et al., 2005). L'ouverture du MPTP, qui conduit à l'effondrement de la polarité mitochondriale, est probablement essentielle pour assurer le renouvellement des mitochondries endommagées (Youle and Narendra, 2011). L'impact de la CsA sur la physiologie mitochondriale et le stress oxydatif a récemment été impliqué pour expliquer son effet sur l'angiogenèse tumorale (Zhou and Ryeom, 2014). L'exposition chronique des cellules à la CsA conduirait, via l'inhibition de la cyclophiline D, à une inhibition du contrôle qualité des mitochondries et à l'installation d'un mitochondriome défectueux. Il pourrait en résulter une libération d'espèces réactives de l'oxygène vers le cytosol à l'origine d'une stimulation de la voie des MAPK et de la prolifération de cellules endothéliales (Youle and Narendra, 2011).

II.5. Modulation de l'expression du VEGF

Les ICN peuvent favoriser l'angiogenèse et la progression tumorale en modulant l'expression du *VEGF*. *In vivo*, des souris porteuses d'un adénocarcinome colique traitées par de la CsA avaient des concentrations sériques de VEGF significativement plus élevées que les souris témoins (Guba et al., 2002). De même, la taille de la tumeur et la densité des capillaires sanguins étaient plus importantes chez les souris sous CsA (Guba et al., 2002). Bien que le VEGF apparaisse comme un acteur important dans ces études, la régulation de la production du VEGF dans les cellules exposées à la CsA n'a pas été complètement élucidée. Basu *et al.* ont montré *in vitro* que la CsA augmentait la transcription du *VEGF* dans 2 lignées cellulaires

de RCC (Basu et al., 2008). Cet effet serait lié à une augmentation de la fixation du facteur de transcription Sp1 (specificity protein 1) sur les régions promotrices du *VEGF*. Dans cette étude, l'augmentation de la transcription du *VEGF* était indépendante de HIF (Basu et al., 2008). Des mécanismes de régulation post-transcriptionnels ont également été rapportés *in vitro* et *in vivo*. Basu *et al.* ont mis en évidence une augmentation de la stabilité de l'ARNm du *VEGF* dans 2 lignées cellulaires de RCC traitées par de la CsA (Basu et al., 2010). La protéine HuR (human antigen R), qui a un rôle important dans la stabilisation de l'ARNm du *VEGF* via une fixation sur les séquences ARE (AU rich element) de la région 3'UTR (untranslated region) (Levy et al., 1998), contribuerait à cet effet (Basu et al., 2010). L'accumulation d'ARNm du *VEGF* dans le cortex rénal de rats traités par de la CsA va également dans le sens d'une augmentation de la stabilité de l'ARNm du *VEGF* en présence de CsA (Shihab et al., 2003). Concernant la traduction du *VEGF*, il s'agit d'un processus contrôlé pouvant impliquer plusieurs mécanismes. Le plus souvent, la traduction du *VEGF* est dépendante de la coiffe, constituée d'une guanine méthylée en position N7 ajoutée à l'extrémité 5' du pré-ARNm. Il existe également un mécanisme indépendant de la coiffe (ou cap independant) faisant intervenir des sites internes d'entrée des ribosomes appelés IRES (internal ribosome entry segment). Deux IRES (IRES-A et IRES-B), qui ont une activité basale faible dans les tissus humains, ont été identifiés dans la région 5' UTR du *VEGF* (Arcontéguy T et al 2013). Ils jouent un rôle important dans des situations particulières, comme l'hypoxie, dans lesquelles la traduction dépendante de la coiffe est diminuée (Philippe et al., 2016). Bien que ce mécanisme soit encore peu exploré actuellement, son étude dans le contexte du RCC semble intéressante.

Dans l'ensemble, l'augmentation de l'expression du VEGF dans les cellules de RCC exposées à la CsA semble établie. Cependant, plusieurs mécanismes ont été décrits et la contribution respective des différents niveaux de la régulation de la production du VEGF dans les effets de

la CsA reste à définir. D'autres mécanismes n'ayant pas été étudiés dans le RCC post-transplantation, comme l'unfolded protein response (UPR), pourraient également avoir un impact sur la sécrétion du VEGF et, plus généralement, sur l'ensemble des protéines sécrétées.

II.6. Stress du réticulum endoplasmique et réponse UPR (unfolded protein response)

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organe intracellulaire constitué d'un réseau important de membranes garantissant la synthèse, le repliement et la maturation des protéines (Wang and Kaufman, 2014). Des protéines chaperonnes, localisées dans la lumière du RE, telles que la protéine BIP (immunoglobulin binding protein) encore appelée GRP78 (glucose related protein 78), GRP94 (glucose related protein 94), la calnexine ou la calréticuline permettent aux protéines d'acquies une conformation adéquate garante de leur activité (Wang and Kaufman, 2014). En cas d'échec, un processus appelé ERAD (ER-associated degradation), associant une ubiquitylation puis une dégradation des protéines mal repliées par le protéasome, peut être mis en place (Wang and Kaufman, 2014). Différentes situations (telles que l'ischémie, la carence en glucose, les désordres de l'homéostasie calcique ou les infections virales) peuvent être à l'origine d'une accumulation de protéines mal repliées dans le RE et aboutir à un stress du RE (Wang and Kaufman, 2014). Dans tous les cas, le stress du RE conduit à l'apparition d'une réponse adaptative appelée UPR permettant de rétablir l'homéostasie cellulaire, par exemple en réduisant la quantité des protéines néo-synthétisées dans le RE. L'UPR est caractérisée par une diminution globale de la synthèse des protéines, par une augmentation de la synthèse de protéines chaperonnes permettant d'accroître les capacités de maturation conformationnelle et par une activation de la dégradation

protéosomale. Lorsque la réponse UPR échoue, le stress du RE se prolonge et la cellule peut déclencher un programme de mort cellulaire apoptotique (Wang and Kaufman, 2014).

II.6.1. Mécanisme d'action

L'UPR est caractérisée par l'activation de 3 médiateurs transmembranaires IRE1- α (inositol requiring enzyme-1 α), PERK (protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase) et ATF6 (activated transcription factor-6) à l'origine de l'activation de 3 voies spécifiques. D'une façon générale, la voie PERK permet de diminuer la traduction des protéines. Les voies IRE1- α et ATF6 permettent d'activer la transcription d'un panel de gènes impliqués dans le repliement des protéines et incluant, en particulier, des gènes codant pour des protéines chaperonnes (*HSPA5* (BIP/GRP78), *CANX* (calnexine), *CALR* (calréticuline)) (figure 7) (Urta et al., 2016).

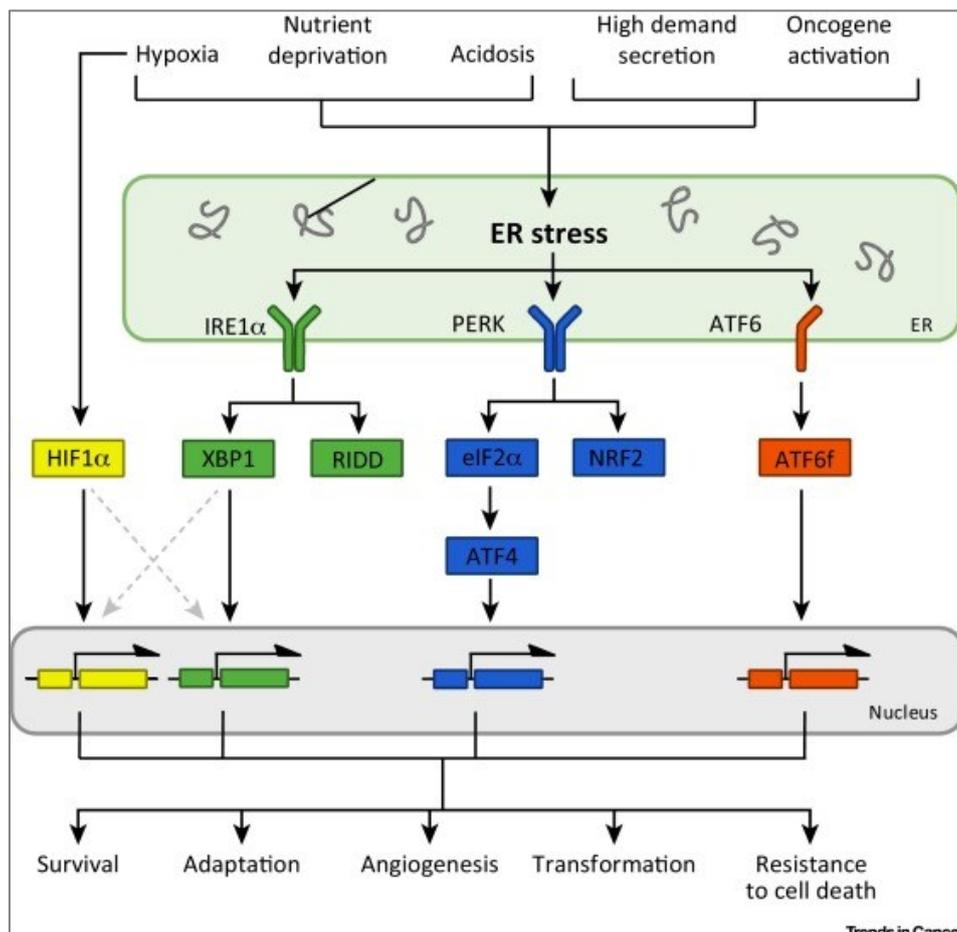


Figure 7 : Représentation schématique de l'UPR (Urta et al., 2016)

Dans des conditions normales, la protéine chaperonne BIP/GRP78 est liée aux protéines IRE1- α , PERK et ATF6. L'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE induit le déplacement de BIP de ses sites de liaison et une dimérisation d'IRE1- α , de PERK et d'ATF6 à l'origine de l'activation des 3 voies correspondantes de l'UPR.

II.6.1.1. La voie IRE1- α

La dimérisation d'IRE1- α induit son autophosphorylation puis son activation à l'origine de l'épissage de l'ARNm du facteur de transcription de XBP1 (X-box binding protein 1) (Yoshida et al., 2001). Le facteur de transcription XBP1s ainsi activé est capable de se fixer sur les éléments de réponse au stress du RE (séquences ERSE - ER stress element) situés dans les régions promotrices de gènes impliqués dans le repliement et le contrôle de la qualité des protéines (*HSPA5*, *CANX*, *CALR*) ou l'ERAD. L'activité RNase d'IRE1- α a par ailleurs été impliquée dans un processus appelé RIDD (regulated IRE1-dependant decay) (Hollien et al., 2009). Ce mécanisme a été initialement décrit comme étant capable de générer la dégradation de certains ARNm localisés dans le RE en les clivant au niveau d'un site consensus similaire à celui des sites d'épissage de XBP1. Les fragments d'ARNm ainsi générés deviennent alors des substrats pour des exo-ribonucléases cellulaires et sont dégradés rapidement (Maurel et al., 2014). Enfin, une activation de la voie JNK-ASK1 (JUN N-terminal kinase – apoptosis signal-regulating kinase 1) a été décrite via la liaison d'IRE1- α à TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) (Chevet et al., 2015).

II.6.1.2. La voie PERK

Après oligomérisation et autophosphorylation, PERK phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α) responsable d'une diminution globale de la traduction des protéines (Chevet et al., 2015). La phosphorylation d'eIF2 α réduit la traduction cap dépendante mais permet la traduction sélective du facteur de transcription ATF4 (activated transcription factor-4) régulant l'expression de gènes impliqués dans le

repliement des protéines, le métabolisme des acides aminés, l'autophagie et l'apoptose (Chevet et al., 2015). L'activation de la transcription de *CHOP* et de *GADD34* par ATF4, contribuant respectivement au contrôle de la réponse pro-apoptotique et à la déphosphorylation d'eIF2 α , a également été mise en évidence. Enfin, l'activation de PERK assure également la phosphorylation de NRF2, un facteur de transcription clé de la réponse anti-oxydante (Cullinan and Diehl, 2004).

II.6.1.3. La voie ATF6

ATF6 est un facteur de transcription transmembranaire. Le stress du RE induit la translocation du précurseur membranaire d'ATF6 depuis le RE vers l'appareil de Golgi où il est clivé par les protéases S1P et S2P (site-1 et site-2 protéase) (Ye et al., 2000). La fraction ATF6f ainsi générée peut se fixer sur les séquences ERSE des régions promotrices de gènes principalement impliqués dans le repliement des protéines et l'ERAD (Chevet et al., 2015).

L'activation de l'UPR en réponse à des situations physiopathologiques peut revêtir plusieurs formes suivant sa durée et son intensité. En effet, suivant l'efficacité de la réponse, c'est-à-dire sa capacité à rétablir l'homéostasie cellulaire et à enrayer l'activation du stress du RE, l'UPR pourra conduire à un mécanisme cytoprotecteur ou, au contraire, à un effet pro-apoptotique. L'UPR a ainsi été impliqué dans de multiples pathologies telles que le cancer, la maladie d'Alzheimer, la maladie de parkinson, le diabète, les accidents vasculaires cérébraux, les maladies cardiaques et rénales (Wang and Kaufman, 2014). Nous nous intéressons plus particulièrement à son implication dans les cancers et évaluons son intérêt dans les cancers post-transplantation.

II.6.2. UPR et cancer

La fonctionnalité de la machinerie de sécrétion est cruciale pour garantir le maintien de la croissance tumorale et de la survie cellulaire (Dejeans et al., 2014). Cette notion est étroitement liée à la dépendance des cellules cancéreuses vis-à-vis de facteurs de croissance impliqués dans des boucles de stimulation autocrines et paracrines (Urta et al., 2016). Dans ce contexte, le rôle des composants de l'UPR a été identifié à différentes étapes cruciales de la transformation maligne (figure 8) (Urta et al., 2016).

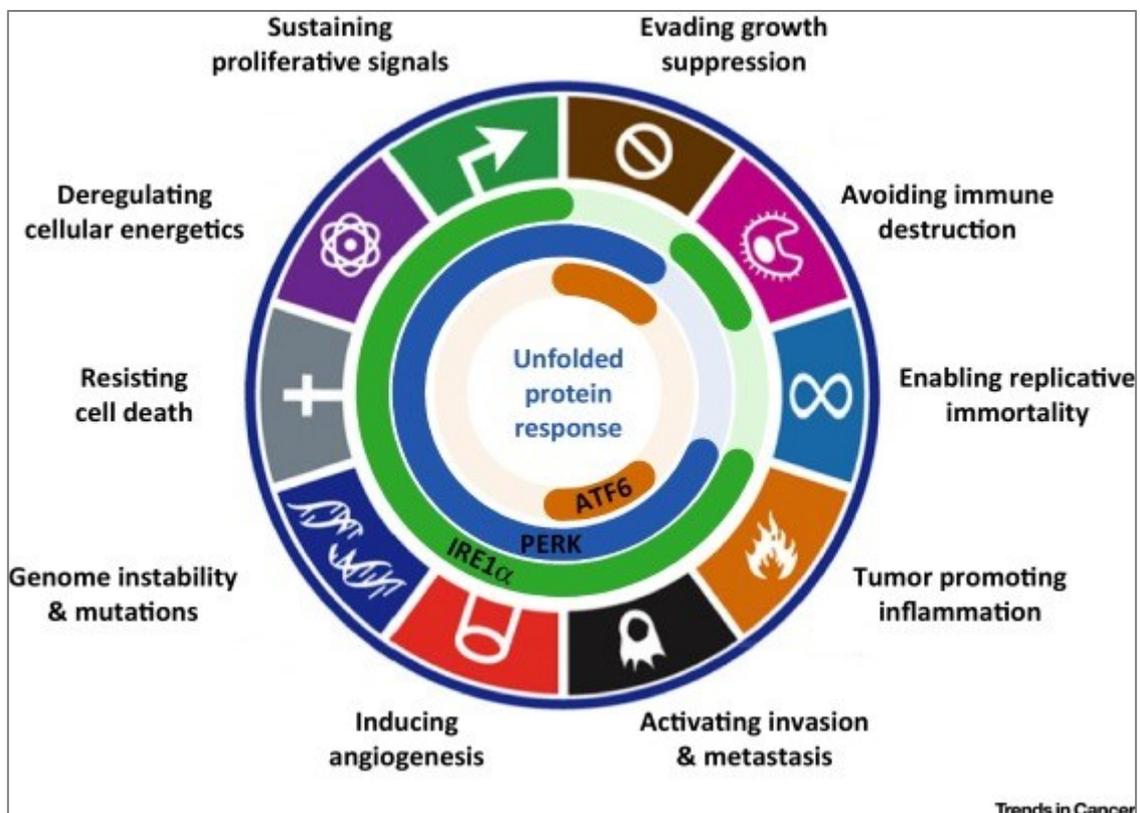


Figure 8 : UPR et événements impliqués dans la progression tumorale (Urta et al., 2016)

Les cellules tumorales sont soumises à des perturbations majeures de leur microenvironnement telles que l'hypoxie ou la privation de nutriments qui les conduisent presque systématiquement à un stress du RE (Urta et al., 2016). Dans ces conditions, la capacité à déclencher une réponse UPR, permettant de rétablir l'homéostasie du RE,

conditionne en partie la survie et la prolifération des cellules tumorales. Ainsi, une activation de l'UPR a été observée dans de multiples lignées de cellules cancéreuses. Un nombre croissant d'études souligne désormais l'impact de l'UPR sur la carcinogenèse chez l'homme (Urrea et al., 2016). La régulation de l'angiogenèse tumorale par l'UPR offre actuellement l'un des meilleurs exemples de l'implication de l'UPR dans la transformation tumorale et est intéressante dans l'étude du RCC.

II.6.2.1. UPR et angiogenèse/VEGF

L'UPR peut stimuler l'angiogenèse en modifiant l'expression de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF-A, le FGF2 (fibroblast growth factor 2), l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8 (Dufey et al., 2015). Concernant le VEGF, sa régulation dans les cellules tumorales soumises à un stress du RE peut faire intervenir la voie PERK (Wang et al., 2012). Ainsi, la fixation du facteur de transcription ATF4 dans le promoteur du *VEGFA* augmente la transcription du *VEGF* et peut induire une modification de l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques dans les cellules tumorales (Wang et al., 2012). La voie IRE1- α de l'UPR a également été impliquée dans la régulation de la production du VEGF dans divers types de tumeurs solides (Chen et al., 2014; Drogat et al., 2007; Ghosh et al., 2010). De façon intéressante, la sécrétion de VEGF par les cellules tumorales est capable d'induire une stimulation de l'UPR dans les cellules endothéliales par l'intermédiaire de la voie mTOR (figure 9) (Dufey et al., 2015).

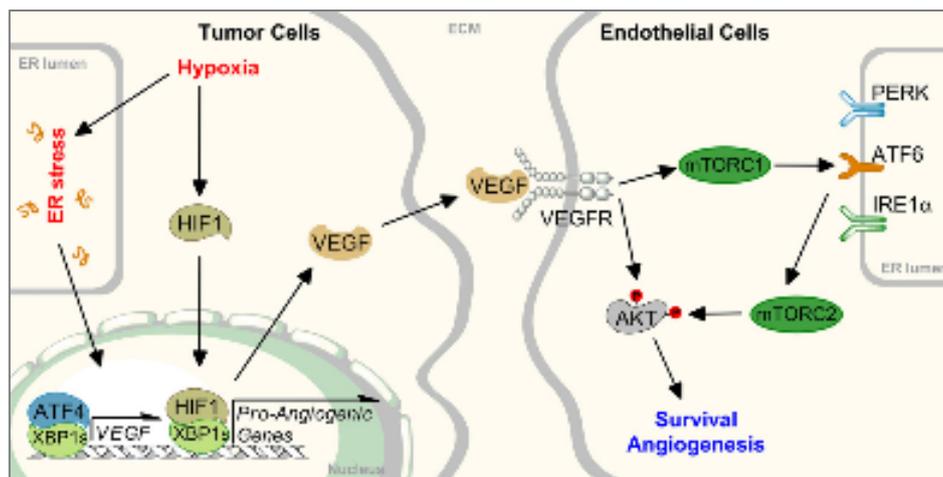


Figure 9 : UPR et angiogenèse (Dufey et al., 2015)

Plus précisément, le VEGF induit une activation rapide des 3 médiateurs de l'UPR (IRE1- α , PERK et ATF6) médiée par le couplage du complexe mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) et de la PLC γ (phospholipase C gamma). L'activation de PERK et d'ATF6 assure la phosphorylation d'AKT médiée par le complexe mTORC2 (Karali et al., 2014). Cette régulation de l'UPR par le VEGF contribuerait à la survie des cellules endothéliales et à l'angiogenèse. Ce mécanisme original, décrit par Karali *et al.* (Karali et al., 2014), ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques. L'utilisation des inhibiteurs de mTOR pourrait ainsi être envisagée pour limiter l'activation chronique de l'UPR et semble particulièrement intéressante dans le contexte des cancers post-transplantation.

La régulation du VEGF par l'UPR illustre ainsi l'importance de la fonctionnalité du RE et de la régulation de la maturation et de la production des protéines (ou « protéostase ») dans la progression tumorale et l'angiogenèse (Devisscher et al., 2016).

II.6.2.2. UPR et autres processus de la progression tumorale

L'UPR contribue également à d'autres événements impliqués dans la progression tumorale tels que l'instabilité génomique, les métastases et l'immunomodulation (figure 8) (Urra et al., 2016). Dans le contexte des cancers post-transplantation, l'étude de l'immunomodulation, bien qu'intéressante, ne sera pas abordée au cours de ce travail. En effet, le stress du RE contribue à la l'exposition de certains antigènes, tels que la calréticuline et l'ERp57, à la surface des cellules contribuant ainsi à l'immunogénicité des cellules cancéreuses (Dufey et al., 2015).

Dans le contexte de la transplantation, des études ont mis en évidence l'impact de la CsA sur le repliement des protéines dans le RE via son interaction avec des protéines membres de la famille des peptidyl-prolyl cis-trans isomérase (PPIase) appelées cyclophilines (Bernasconi et al., 2010; Lamoureux et al., 2012; Lodish and Kong, 1991; Price et al., 1994). Dans ce contexte, l'étude de l'effet de l'exposition chronique à la CsA sur l'UPR et la progression des tumeurs post-transplantation est intéressante.

II.6.3. Cyclosporine et UPR

La CsA est capable d'interagir avec différents membres de la famille des cyclophilines localisées dans les compartiments cellulaires (figure 10).

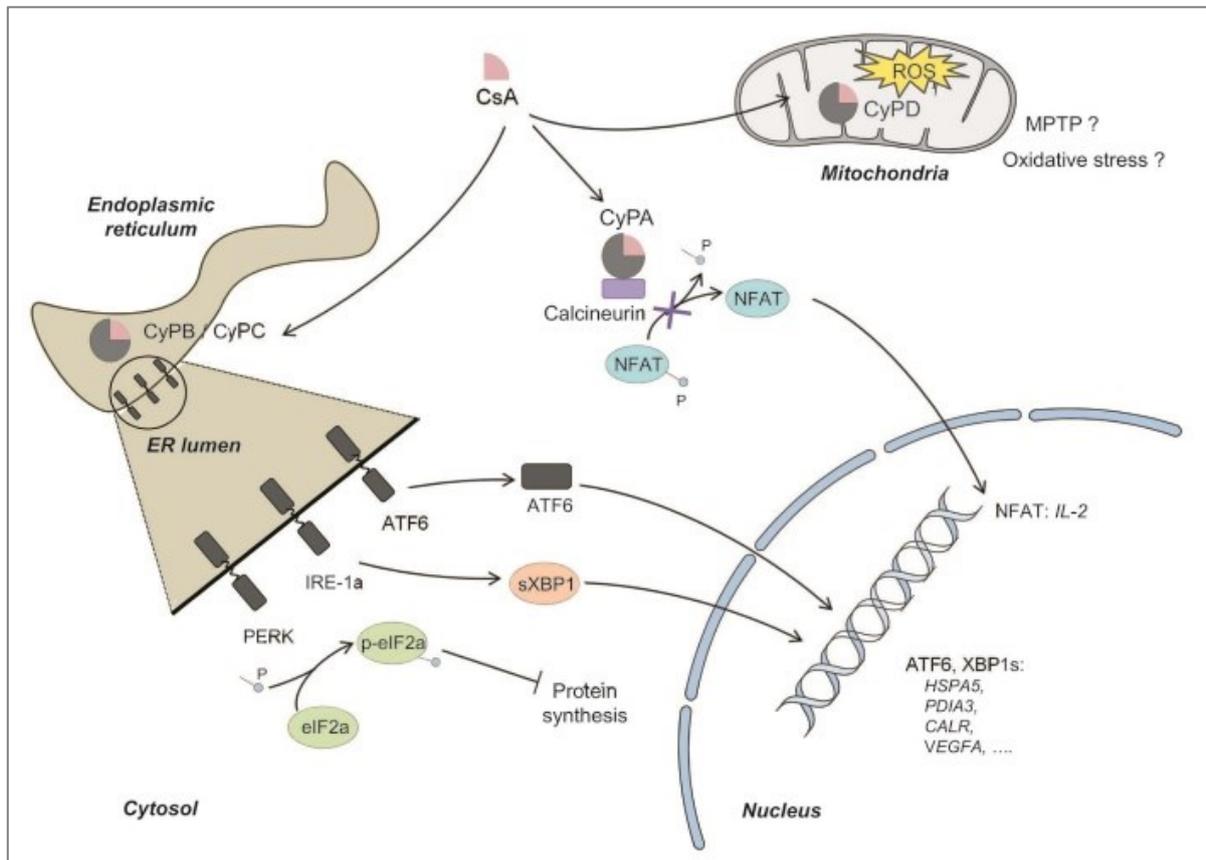


Figure 10 : Les cyclophilines et la régulation du repliement des protéines (Bodeau et al., Clinical Science)

La cyclophiline A, localisée dans le cytosol des cellules eucaryotes, est une cible directe de la CsA et contribue à l'action inhibitrice de la CsA sur la calcineurine (Clipstone and Crabtree, 1992). L'interaction de la CsA avec la cyclophiline D, située au niveau de la mitochondrie, a été impliquée dans l'inhibition du MPTP et serait responsable d'une altération de la physiologie mitochondriale et d'une libération d'espèces réactives de l'oxygène conduisant à un stress oxydatif (Zhou and Ryeom, 2014). Son interaction avec les cyclophilines B et C, des PPIases localisées dans la lumière du RE (Bukrinsky, 2015), est responsable de l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE. Des études *in vitro* ont également montré

que la CsA était également capable de déplacer la cyclophiline B du RE et d'induire sa sécrétion (Lamoureux et al., 2012). Un effet direct sur l'ERAD et, plus globalement, sur la fonctionnalité du RE dans son rôle de contrôle de la qualité des protéines néo-synthétisées résulterait de l'interaction entre la CsA et la cyclophiline B (Bernasconi et al., 2010). Cet effet a plus particulièrement été examiné dans des études ayant évalué la néphrotoxicité de la CsA (Han et al., 2008; Lamoureux et al., 2011; Pallet et al., 2008). Ces études ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression des protéines chaperonnes BIP/GRP78, GRP94 et ORP150 dans des lignées de cellules épithéliales rénales exposées à la CsA (Bouvier et al., 2012; Lamoureux et al., 2011; Pallet et al., 2008). La contribution de l'UPR dans la néphrotoxicité de la CsA a été confirmée *in vivo* par l'équipe de Pallet *et al.* (Pallet et al., 2008). Dans cette étude, le ciblage de la voie PERK de l'UPR chez le rat diminuait la néphrotoxicité induite par la CsA (Pallet et al., 2008). L'induction chronique de l'UPR contribuerait ainsi à l'apparition des lésions tubulaires rénales qui altèrent le rein greffé (Pallet et al., 2008). Récemment, l'induction de l'UPR par la CsA a également été mise en évidence dans des lignées de cellules cancéreuses (Ciechomska et al., 2013; Ram and Ramakrishna, 2014). Ainsi, l'activation du stress du RE et de l'UPR a été décrite dans des cellules tumorales cervicales et a été associée à l'inhibition de la cyclophiline B par la CsA (Ram and Ramakrishna, 2014). Dans ce modèle, l'incapacité de l'UPR à restaurer la fonctionnalité du RE et la synthèse des protéines conduisait à la vacuolisation des cellules puis à un type de mort cellulaire non-apoptotique appelée paraptose (Ram and Ramakrishna, 2014). Dans une autre étude réalisée sur des lignées cellulaires de gliome, l'activation des voies IRE1- α et PERK de l'UPR a été observée après une exposition à la CsA (Ciechomska et al., 2013). Dans ce cas, l'induction du stress du RE par la CsA a été associée à une activation cytoprotectrice de l'autophagie permettant de recycler et d'éliminer les protéines altérées (Ciechomska et al., 2013).

De plus en plus d'études ont ainsi mis en évidence l'impact de la CsA sur la fonctionnalité du RE (Bernasconi et al., 2010; Lamoureux et al., 2012; Lodish and Kong, 1991; Price et al., 1994). Le stress du RE ainsi généré conduit à l'apparition d'une réponse UPR. En fonction de son intensité et de sa capacité à rétablir l'homéostasie cellulaire, l'UPR peut revêtir différents aspects ayant des conséquences variées sur les tissus exposés. Son implication à différentes étapes cruciales de la transformation maligne est un des aspects les plus étudiés actuellement. Dans ces conditions, l'étude de l'induction chronique de l'UPR dans les tissus exposés à la CsA et de ses conséquences sur le développement des tumeurs post-transplantation paraît intéressante et n'a pas encore été explorée actuellement.

II.6.4. Perspectives

II.6.4.1. L'UPR comme nouvelle cible thérapeutique dans les cancers post-transplantation ?

L'UPR constitue actuellement une nouvelle cible d'intérêt dans le traitement des cancers (Hetz et al., 2013). Des travaux récents ont évalué le ciblage de la voie IRE1- α de l'UPR jouant un rôle essentiel dans le développement du myélome multiple (Ri et al., 2012). Dans cette étude, Ri *et al.* ont identifié pour la première fois la toyocamycine, un inhibiteur de la voie IRE1- α empêchant l'épissage du facteur de transcription XBP1. Son rôle synergique avec le bortézomib paraît intéressant dans le traitement du myélome multiple chimiorésistant. En transplantation d'organe, le ciblage de la réponse UPR au cours du stress du RE pourrait constituer une nouvelle stratégie prometteuse dans le traitement des cancers post-transplantation.

II.6.4.2. UPR et biomarqueurs

Les biomarqueurs du stress du RE pourraient être utilisés pour détecter précocement un processus pathologique et améliorer le diagnostic des cancers post-transplantation. En effet, dans ce domaine, des améliorations sont possibles car les seules recommandations préconisent une surveillance régulière des reins natifs par échographie (Chapman et al., 2013; Tillou et al., 2012). L'utilisation des biomarqueurs de l'UPR a été proposée dans d'autres cancers (Chignard et al., 2006; Galmiche et al., 2017). Chignard *et al.* ont ainsi proposé d'évaluer de façon plus approfondie l'utilisation des protéines chaperonnes (calréticuline et ERp57) dans le diagnostic du carcinome hépatocellulaire (CHC). Dans cette étude, des peptides dérivés de la calréticuline et d'ERp57 ont été identifiés dans les séra des patients qui avaient développé un CHC. Les concentrations de ces peptides étaient significativement plus élevées chez les patients malades comparativement aux sujets sains (Chignard et al., 2006). Toutefois, les études cliniques ayant examiné l'utilisation des biomarqueurs de l'UPR en tant que marqueurs prédictifs de la survie des patients sont parfois discordantes (Galmiche et al., 2017). L'utilisation d'un marqueur unique et/ou modérément spécifique, tel que les protéines chaperonnes, et ne reflétant pas l'activation spécifique d'une voie de l'UPR peut en partie expliquer ces discordances (Galmiche et al., 2017). Seule la recherche combinée de plusieurs marqueurs semble satisfaisante afin d'établir une véritable signature de l'UPR garante de la spécificité et de la fiabilité des résultats. L'étude d'Andruska *et al.* offre le premier exemple du rôle prédictif des signatures de l'UPR sur la réduction de la survie et la résistance au tamoxifène chez des patientes atteintes de cancer du sein ER α + (estrogen receptor α -positive) recevant du tamoxifène (Andruska et al., 2015). Ainsi, l'utilisation de biomarqueurs spécifiques de l'UPR offre également la possibilité de suivre la réponse à des traitements médicaux ou de détecter précocement une rechute. Ceci renvoie à la notion récente que les marqueurs tumoraux ne doivent pas seulement être considérés comme un reflet de la masse

tumorale mais également comme un outil adapté au suivi de la protéostase en clinique (Galmiche et al., 2016).

Au-delà de l'amélioration des performances du diagnostic et de la prise en charge, la recherche de nouveaux biomarqueurs s'inscrit dans une optique de médecine personnalisée. Dans ce domaine, la combinaison de plusieurs approches paraît indispensable pour répondre à la problématique d'hétérogénéité et de variabilité inter-individuelle. Dans le contexte de la transplantation et du RCC, la recherche des polymorphismes du *VEGF* pourrait également être envisagée. Cette approche permettra également d'envisager la notion de variabilité de l'activation de l'UPR en réponse à des stimuli angiogéniques chez les patients transplantés. En effet, une étude récente a montré que la sécrétion de VEGF par les cellules tumorales pouvait activer les médiateurs PERK et ATF6 de l'UPR par l'intermédiaire d'un couplage de la PLC γ au complexe mTORC1 (Karali et al., 2014). Les polymorphismes du *VEGF*, qui peuvent moduler l'expression du VEGF, pourraient donc avoir des conséquences sur l'activation de l'UPR. Ces deux approches complémentaires sont donc intéressantes dans le contexte des cancers post-transplantation.

III. Polymorphismes du VEGF et RCC

Le VEGF est un facteur de croissance crucial dans le développement du RCC. Une augmentation de son expression a été mise en évidence *in vitro* et *in vivo* après une exposition aux ICN (Basu et al., 2008, 2010; Guba et al., 2002). Des mécanismes de régulation transcriptionnel et post-transcriptionnel ont été évoqués pour expliquer cet effet. Le VEGF est un gène hautement polymorphe localisé sur le bras court du chromosome 6 (position 6p21.1). Des polymorphismes génétiques (ou single nucleotide polymorphisms – SNP) ont été localisés dans le promoteur et dans les 5'- et 3' UTR impliqués dans la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle du VEGF (figure 11) (Jain et al., 2009).

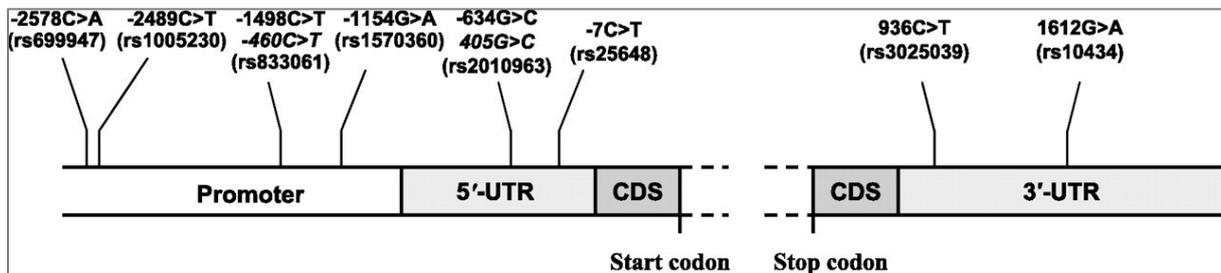


Figure 11 : Position relatives des principaux SNP dans le VEGF (Jain et al., 2009)

Des séquences consensus permettant la fixation des facteurs de transcription Sp1/Sp3, AP-1/AP-2 (Activator protein 1/2), STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) et HIF ont été identifiées dans le promoteur du VEGF (Pagès and Pouysségur, 2005). L'étude des polymorphismes localisés dans le promoteur du VEGF qui pourraient modifier la fixation de facteurs de transcription impliqués dans la physiopathologie du RCC, tels que HIF, est intéressante. Dans la forme familiale de la maladie de VHL, certaines mutations de VHL ont été associées à une diminution de l'interaction entre pVHL et Sp1 à l'origine d'une augmentation de la transcription du VEGF Sp1-induite (Pagès and Pouysségur, 2005). Les résultats d'une étude *in vitro* réalisée sur différentes lignées cellulaires de RCC sont également en faveur de l'étude des polymorphismes localisés dans les sites de fixation de Sp1. Dans cette étude, l'augmentation de l'expression du VEGF, observée après une exposition des

cellules à la CsA, a été associée une élévation de la phosphorylation de Sp1 qui permettrait d'accroître sa fixation sur le promoteur du *VEGF* (Basu et al., 2008).

Des mécanismes de régulation post-transcriptionnels impliquant les régions 5'- et 3' UTR ont également été décrits et rendent l'étude des polymorphismes dans ces régions du *VEGF* intéressante. Des séquences riches en résidus adénylate et uridylate (ARE ou AU rich element) localisées dans la région 3' UTR ont été impliquées dans l'augmentation de la stabilité de l'ARNm du *VEGF* en hypoxie (Levy et al., 1998). Certaines protéines, telles que HuR, contribuent à la stabilité de l'ARNm du *VEGF* en hypoxie en se fixant sur ces séquences (Levy et al., 1998). De façon intéressante, ce mécanisme a été évoqué par Basu *et al.* pour expliquer l'augmentation de l'expression du VEGF dans des cellules de RCC exposées à la CsA (Basu et al., 2010). L'expression du *VEGF* peut également être modulée par la fixation de miRNA (miR) ayant un impact sur la stabilité de son ARNm ou sur sa traduction. Récemment, un nombre important de sites de fixation de miR a été identifié dans la région 3' UTR (Arcondéguy et al., 2013; Hua et al., 2006; Karaa et al., 2009). La présence de polymorphismes dans des séquences consensus de fixation de miR a déjà été associée à une diminution de leur fixation (Zhao et al., 2017).

Concernant la traduction du *VEGF*, deux IRES (Internal Ribosome Entry Site), A et B, ont été décrits dans la région 5'-UTR (Arcondéguy et al., 2013). Un dysfonctionnement de l'IRES-B du *VEGF* et une diminution de la traduction cap-indépendante ont été observés en présence du polymorphisme *VEGF* c. -634C>G localisé dans la région 5'UTR (Lambrechts et al., 2003). En hypoxie, un rôle important de la traduction IRES-dépendante du *VEGF* a été mis en évidence (Bornes et al., 2007; Philippe et al., 2016). Dans ces conditions, la traduction IRES-dépendante du *VEGF* pourrait être activée par la voie PERK de l'UPR (Philippe et al., 2016). La traduction dépendante des IRES peut également être modulée par certains miR.

Karaa *et al.* ont ainsi décrit une régulation négative de la traduction IRES-B dépendante par le miR-16 (Karaa et al., 2009).

Dans ce contexte, l'étude des polymorphismes du *VEGF* localisés dans le promoteur, les 5'- et 3' UTR pourrait être intéressante pour identifier des sous-groupes de patients transplantés ayant un risque accru de développer un RCC. Au cours de ces dernières années, l'importance de la variabilité génétique du *VEGF* et du *VEGFR* a été étudiée avec succès dans certains cancers (foie, prostate, sein, vessie) (Jain et al., 2009; Rogers and D'Amato, 2012). Cependant, il n'existe pas d'étude ayant recherché une association entre les polymorphismes du *VEGF* ou des *VEGFR* et le risque de RCC chez les patients transplantés alors que son incidence est multipliée par un facteur 15 dans cette population (Kasiske et al., 2004). La modulation de l'expression du *VEGF* par les ICN, mise en évidence par Basu *et al.* (Basu et al. 2008; Basu et al. 2010), rend l'étude des polymorphismes du *VEGF* et des *VEGFR* particulièrement intéressante dans ce contexte. Nous proposons ici une synthèse des études ayant recherché une association entre les polymorphismes du *VEGF* ou du *VEGFR* et le développement ou l'agressivité du RCC dans la population générale ainsi qu'une évaluation de leur intérêt dans la population transplantée.

III.1. Association entre les polymorphismes du *VEGF* et le risque de RCC

De nombreux polymorphismes du *VEGF* ont été examinés au cours de ces dernières années. Les conclusions des études sont parfois contradictoires en fonction des SNP étudiés, de la population d'étude et du nombre de sujets inclus. Parmi les polymorphismes les plus fréquemment observés dans la population caucasienne (tableau VI), certains ont été associés au risque, à la progression ou à l'agressivité des cancers.

Tableau VI : Caractéristiques des principaux SNP du *VEGF* étudiés dans le RCC

Gène	Polymorphismes	Identifiant rs	Position dans le gène	Conséquence sur la séquence en acides aminés	Allèle ancestral	Fréquence de l'allèle minoritaire	Conséquences fonctionnelles <i>in vitro</i>	Etudes cliniques	
								Pas d'association	Association
<i>VEGF</i>	c.-2578 A>C	rs699947	Promoteur	/	A	A=32,45%	-	(Garcia-Donas et al., 2011; Sáenz-López et al., 2013)	(Ajaz et al., 2011; Dornbusch et al., 2016; Kawai et al., 2007; Lu et al., 2015; Ma et al., 2015a; Scartozzi et al., 2013; Shen et al., 2015; Xian et al., 2015a; Yang and Chen, 2014; Zhong et al., 2014a)
	c.-2489 C>T	rs1005230	Promoteur	/	C	T=32,47%	-	-	-
	c.-460 C>T	rs833061	Promoteur	/	C	C=36,98%	DL* entre <i>VEGF</i> -460C et une insertion de 18 pb* créant 1 site de fixation pour Sp1 (Wu et al., 2013)	(Sáenz-López et al., 2013)	(Bruyère et al., 2010; Lu et al., 2015; Scartozzi et al., 2013; Xian et al., 2015a)
	c.-1154 G>A	rs1570360	Promoteur	/	G	A=18,87%	Diminution de 25% de l'activité du promoteur en présence de <i>VEGF</i> -1154A (Lambrechts et al., 2003)	(Bruyère et al., 2010; Dornbusch et al., 2016; Garcia-Donas et al., 2011; Ma et al., 2015a; Xian et al., 2015a; Zhong et al., 2014a)	(Kawai et al., 2007; Yang and Chen, 2014)
	c.-634 G>C	rs2010963	5'-UTR	/	G	C=32,61%	<i>VEGF</i> -634G associé à un dysfonctionnement de l'IRES-B (Lambrechts et al., 2003)	(Bruyère et al., 2010; Dornbusch et al., 2016; Garcia-Donas et al., 2011; Kawai et al., 2007; Lu et al., 2015; Sáenz-López et al., 2013; Shen et al., 2015; Xian et al., 2015a; Yang and Chen, 2014)	(Ma et al., 2015a; Scartozzi et al., 2013; Zhong et al., 2014a)
	c.-7 C>T	rs25648	5'-UTR	p.Ser178	C	T=12,12%	-	(Scartozzi et al., 2013)	-
	c.936 C>T	rs3025039	3'-UTR	/	C	T=13,36%	<i>VEGF</i> 936T associé à une diminution des concentrations de VEGF (Jakubowska et al., 2008; Krippel et al., 2003; Renner et al., 2000)	(Abe et al., 2002; Ajaz et al., 2011; Bruyère et al., 2010; Dornbusch et al., 2016; Lu et al., 2015; Sáenz-López et al., 2013; Scartozzi et al., 2013; Shen et al., 2015)	(Gong et al., 2017; Xian et al., 2015a)
	c.1612 G>A	rs10434	3'-UTR	/	G	A=34,76%	-	(Abe et al., 2002; Scartozzi et al., 2013; Shen et al., 2015; Xian et al., 2015a)	-

*DL : déséquilibre de liaison ; *pb : paire de bases

Une méta-analyse récente ayant examiné les données de 8 études a conclu à l'augmentation significative du risque de RCC chez les patients porteurs du génotype *VEGF* -2578 AA (rs699947) et chez les patients ayant un génotype *VEGF* 936 TT (rs3025039) (Gong et al., 2017). En revanche, il n'a pas été mis en évidence d'association entre le risque de RCC et les autres polymorphismes du *VEGF* inclus dans cette méta-analyse (c.1612 G>A (rs10434), c.-460 C>T (rs833061), c.-634 G>C (rs2010963) et c.-1154 G>A (rs1570360). Concernant *VEGF* c. -2578 A>C (rs699947), parmi les 8 études incluses dans la méta-analyse, cinq d'entre-elles avaient étudié ce polymorphisme (Ajaz et al., 2011; Lu et al., 2015; Sáenz-López et al., 2013; Shen et al., 2015; Xian et al., 2015a). Seule l'équipe de Sáenz-Lopez *et al.* ne retrouvait pas d'association significative avec le risque de RCC (Sáenz-López et al., 2013). L'analyse de l'ensemble des données a montré que *VEGF* -2578 A était associé à une augmentation du risque de RCC quel que soit le modèle génétique utilisé (Gong et al., 2017). Dans la même méta-analyse, la compilation des résultats de 6 études incluant 1445 cas de RCC et 2337 témoins a conclu à l'augmentation significative du risque de RCC chez les patients porteurs du génotype *VEGF* 936 TT (Gong et al., 2017). Des résultats similaires avaient été mis en évidence dans l'étude de Xian *et al.* ayant inclus 266 cas de RCC et 532 témoins issus de la population chinoise (Xian et al., 2015a). A l'inverse, un rôle protecteur de *VEGF* 936 T a été mis en évidence dans le cancer du sein (Jakubowska et al., 2008; Krippel et al., 2003). Dans le cadre de l'étude du risque de cancer, la prise en compte de la notion d'hétérogénéité des tumeurs et du terrain génétique est importante et peut expliquer l'observation de discordances entre les études (Rogers and D'Amato, 2012). Cependant, la diminution des concentrations sériques de VEGF associée à *VEGF* 936 T, à la fois observée chez les patientes ayant développé un cancer du sein et dans la population générale, va également dans le sens d'un rôle protecteur de cet allèle (Jakubowska et al., 2008; Krippel et al., 2003; Renner et al., 2000). Ainsi, dans l'étude cas-témoins de Krippel *et al.*, *VEGF* 936 T a

été associé à une réduction du risque de cancer du sein (OR=0,51 ; IC 95% : 0,38 – 0,70) et à une diminution des concentrations de VEGF. Dans cette étude, les patientes *VEGF* 936 TT avaient une concentration médiane de VEGF de 9 pg/mL. Celles ayant un génotype CT ou CC avaient des concentrations de VEGF respectivement égales à 28 pg/mL et à 37 pg/mL (Krippel et al., 2003). Ce résultat a été confirmé dans l'étude de Jakubowska *et al.* qui a montré que les génotypes TT et CT étaient protecteurs dans le cancer du sein (OR=0,69 ; IC 95% [0,41-0,98] ; p=0,042) (Jakubowska et al., 2008). Un lien entre *VEGF* 936 T et la concentration de VEGF a également été mis en évidence par Renner *et al.* dans la population générale et renforce l'intérêt pour ce polymorphisme (Renner et al., 2000). Dans cette étude, les patients *VEGF* 936 CT ou TT avaient une concentration de VEGF significativement plus basse que les patients homozygotes *VEGF* 936 CC (9,1 vs. 28 pg/mL, p=0,033) (Renner et al., 2000). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet protecteur de l'allèle T dans ce contexte. Des analyses bio-informatiques ont montré que la mutation 936 C>T était associée à la perte d'un site de fixation pour le facteur de transcription AP-4 (Renner et al., 2000). Cependant, aucune analyse *in vitro* n'a été menée actuellement pour confirmer cette hypothèse. Par ailleurs, ce polymorphisme est localisé dans la région 3' UTR à proximité d'une séquence ARE jouant un rôle important dans la stabilité de l'ARNm du *VEGF* (Levy et al., 1998). Un déséquilibre de liaison avec un polymorphisme situé dans cette région pourrait également être envisagé. Dans tous les cas, la significativité des résultats observés dans de petites cohortes souligne l'importance de ce polymorphisme.

Bruyère *et al.*, ayant étudié les polymorphismes c.-460 C>T (rs833061), c.-1154 G>A (rs1570360), c.-634 G>C (rs2010963) et c.936 C>T (rs3025939), ont montré que les patients ayant un génotype *VEGF* -460 TT avaient un risque de RCC augmenté (OR=14,15 ; IC 95% : 1,9 – 105,41 ; p = 0.0017) (Bruyère et al., 2010). Un résultat discordant a été publié dans une étude réalisée dans la population chinoise. Dans cette étude, le génotype *VEGF* -460 CC était

associé à une augmentation du risque de RCC (Lu et al., 2015). Ces données soulignent l'importance de la confirmation *in vitro* de l'effet d'un polymorphisme. Une analyse fonctionnelle de l'effet de *VEGF* c.-460 C>T a été proposée dans une autre étude réalisée dans la population chinoise (Wu et al., 2013). Dans cette étude, les deux polymorphismes c.-460 C>T (rs833061) et c.-1154 G>A (rs1570360), localisés dans le promoteur du *VEGF*, ont été associés à une augmentation du risque d'hépatocarcinome. Ces résultats ont été complétés par une analyse fonctionnelle *in vitro*. Quatre plasmides pGL3 correspondant aux 4 haplotypes *VEGF* c.-460 C>T/c.-1154 G>A TA, CA, TG et CG ont été utilisés. L'haplotype CA a été associé *in vitro* à une augmentation de l'activité du promoteur du *VEGF*. Cet effet a été expliqué par l'existence d'un déséquilibre de liaison total entre *VEGF* c.-460 C et une insertion de 18 paires de bases (pb) dans le promoteur créant un site de fixation pour le facteur de transcription Sp1 (Wu et al., 2013).

L'étude par haplotype, correspondant à la combinaison d'allèles de deux ou plusieurs loci différents sur un même chromosome, est également intéressante pour tenir compte de l'effet simultané de plusieurs polymorphismes en déséquilibre de liaison. Dans le promoteur, des déséquilibres de liaison entre *VEGF* c.-2578 C>A (rs699947), -1154 G>A (rs1570360) et -634 G>C (rs2010963) ont été décrits (Lambrechts et al., 2003). Cet haplotype a été étudié par Lambrechts *et al.* dans le cadre de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Lambrechts et al., 2003). Dans cette étude, les haplotypes *VEGF* -2578A/-1154A/-634G (AAG) et *VEGF*-2578A/-1154G/-634G (AGG) ont été associés à une augmentation du risque de SLA (OR= 1,8 ; p=0,00004) et à une diminution des concentrations de VEGF *in vivo*. *In vitro*, AAG et AGG ont respectivement été associés à une diminution de 41% et de 30% de l'activité du promoteur du *VEGF* comparativement à l'haplotype CGC (p=0,002). Une analyse fonctionnelle de l'effet de *VEGF* c.-1154 G>A et -634 G>C a également été effectuée de façon à évaluer l'effet de chaque polymorphisme de façon indépendante. Une diminution de

25% de l'activité du promoteur a été observée en normoxie et en hypoxie en présence de *VEGF* -1154 A ($p < 0,0001$). Le polymorphisme *VEGF* c.-634 G>C, localisé dans le 5'UTR, a été associé à un dysfonctionnement de l'IRES-B. En présence de *VEGF* -634 G, une réduction de 23% de l'initiation de la traduction au codon CUG a été observée en hypoxie ($p < 0,001$). Dans le contexte du RCC, les études ayant inclus ces polymorphismes n'ont pas souvent mis en évidence d'association entre *VEGF* c. -2578 C>A, *VEGF* c. -1154 G>A, *VEGF* c. -634 G>C et le risque de cancer (tableau VI). Cependant, l'analyse par haplotype a rarement été envisagée et a pu entraîner un biais de l'estimation de l'effet génétique.

III.2. Association entre les polymorphismes du *VEGF* et l'agressivité des cancers

Une relation entre le niveau d'expression du VEGF dans les tumeurs rénales et la survie globale des patients ayant été mise en évidence (Minardi et al., 2013), des études se sont intéressées à l'impact des polymorphismes du *VEGF* sur l'agressivité du RCC. Dans ces études, la taille de la tumeur, le stade de la maladie et/ou la survie des patients ayant développé un RCC ont été pris en compte. Cependant, la plupart de ces études ayant été effectuée sur les populations asiatiques, les résultats sont difficilement superposables à la population caucasienne et doivent être interprétés avec précaution. L'étude d'Abe *et al.* n'a pas montré de corrélation entre le grade la tumeur et les polymorphismes *VEGF* c.936 C>T (rs3025939) et c.1612 G>A (rs10434) dans la population japonaise (Abe et al., 2002). Une autre étude japonaise ayant étudié les polymorphismes *VEGF* c.-2578 A>C (rs699947), c.-1154 G>A (rs1570360) et c.-634 G>C (rs2010963) a montré une association entre la survie, le nombre de métastases et *VEGF* c.-2578 A>C (Kawai et al., 2007). Une association entre la taille, le stade de la tumeur et *VEGF* c.-1154 G>A a également été observée dans cette étude. En revanche, aucune association avec le pronostic ou la survie n'a été mise en évidence avec

le polymorphisme *VEGF* c.-634 G>C (Kawai et al., 2007). Trois équipes chinoises ont également étudié ces polymorphismes. Leurs conclusions diffèrent malgré un nombre important de patients inclus et une population *a priori* homogène d'une étude à l'autre (Ma et al., 2015a; Yang and Chen, 2014; Zhong et al., 2014a). Le seul résultat concordant concernait le polymorphisme *VEGF* c.-2578 A>C : le génotype AA a été associé à des tumeurs plus grandes, de stade plus élevé et à une survie diminuée. Les études réalisées dans la population caucasienne sont plus rares. En 2012, Scartozzi *et al.*, ont montré une survie (globale et sans progression) diminuée pour les génotypes *VEGF* c.-2578 CC (rs699947), c.-460 TT (rs833061) et c.-634 CC (rs2010963) chez les patients traités par sunitinib (Scartozzi et al., 2013). Une autre étude, réalisée chez des patients atteints de RCC métastasé et traités par sunitinib, a montré une diminution de la survie sans progression chez les patients présentant le génotype c.-2578 AA. Les autres polymorphismes inclus dans cette étude (*VEGF* c.-1154 G>A (rs1570360), c.-634 G>C (rs2010963) et c.936 C>T (rs3025939)) n'avaient pas d'effet sur la survie (Dornbusch et al., 2016).

III.3. Association entre les polymorphismes des *VEGFR* et la survie des patients

L'étude des polymorphismes des *VEGFR* qui peuvent avoir un impact sur les voies de signalisation angiogénique est intéressante dans le contexte du RCC. Les études ayant examiné les polymorphismes des *VEGFR* les plus fréquemment observés (tableau VII) ont principalement été conduites chez des patients traités par ITK. En effet, les récepteurs du VEGF (FLT1, KDR, FLT4) sont la cible des ITK utilisés en première ligne ou en deuxième ligne de traitement du RCC (Sunitinib, Sorafénib, Pazopanib, Axitinib) (Porta et al., 2017).

Tableau VII : Caractéristiques des principaux SNP des récepteurs *KDR* et *FLT4* étudiés dans le RCC

Gènes	Polymorphismes	Identifiant rs	Position dans le gène	Conséquence sur la séquence en acides aminés	Allèle ancestral	Fréquence de l'allèle minoritaire	Conséquences fonctionnelles <i>in vitro</i>	Etudes cliniques	
								Pas d'association	Association
<i>KDR</i>	c.1416 T>A	rs1870377	Exon	p.Gln472His	T	A=21,19%	-	(Dornbusch et al., 2016; Garcia-Donas et al., 2011)	(van der Veldt et al., 2011)
	c.889 C>T	rs2305948	Exon	p.Val297Ile	C	T=15,26%	-	(Dornbusch et al., 2016)	-
<i>FLT4</i>	c.1480 A>G	rs307826	Exon	p.Thr494Ala	T	C=9,0%	-	-	(Beuselinck et al., 2013; Dornbusch et al., 2016; Garcia-Donas et al., 2011)
	c.3971 G>T	rs307821	3'-UTR	p.Arg1324Leu	C	A=8,3%	Fonction de FLT4 affectée par le changement d'AA (Garcia- Donas et al., 2011)	-	(Beuselinck et al., 2013; Garcia-Donas et al., 2011)

Dans ces études, un examen de l'impact des polymorphismes des *VEGFR* sur la réponse au traitement, estimée par la survie globale ou la survie sans progression des patients, a été réalisé. En 2011, une étude prospective et multicentrique a recherché des marqueurs génétiques de survie et/ou de toxicité chez des patients ayant un RCC et traités en première intention par du sunitinib (Garcia-Donas et al., 2011). Seize polymorphismes dont certains sur les gènes *VEGF*, *KDR* et *FLT4* ont été analysés dans cette étude. Une diminution significative de la survie sans progression a été mise en évidence chez les patients ayant un génotype *FLT4* c.1480 AG (rs307826) ou *FLT4* c.3971 GT (rs307821). Ces effets ont récemment été confirmés dans l'étude de Beuselinck *et al.* (Beuselinck et al., 2013). Dans cette étude, *FLT4* 3971 T a été associé à une diminution de la survie sans progression et *FLT4* 3971 T et 1480 G ont été associés à une diminution de la survie globale. De façon intéressante, ces polymorphismes sont responsables d'un changement de la séquence en acides aminés (AA) sur le VEGFR3. De façon intéressante, le changement d'AA associé à *FLT4* c.3971 G>T est localisé dans le domaine 5 (D5) du VEGFR3 ayant un rôle important dans l'activation du récepteur (Garcia-Donas et al., 2011). Concernant le polymorphisme *KDR* c.1416 T>A, une diminution de la survie globale a été observée chez les patients *KDR* 1416 TT (van der Veldt et al., 2011). La même tendance avait été observée par Beuselinck *et al.* bien que la diminution de survie n'ait pas été significative dans ce cas (Beuselinck et al., 2013).

III.4. Intérêt des polymorphismes du *VEGF* et des *VEGFR* dans la population transplantée

L'utilisation des génotypes du *VEGF* et des *VEGFR* constituerait une approche thérapeutique innovante afin d'adapter le traitement immunosuppresseur en fonction du risque de développer un cancer post-transplantation. Un changement précoce de classe d'immunosuppresseur des ICN vers les inhibiteurs de mTOR pourrait ainsi être envisagé chez les sous-groupes de patients identifiés comme étant à risque de développer un RCC. Cette stratégie thérapeutique est de plus en plus étudiée mais ne fait pas l'objet de recommandation (Geissler 2015). En effet, les inhibiteurs de mTOR ont des propriétés antiprolifératives, anti-angiogéniques et peuvent être utilisés en deuxième ligne de traitement du RCC (Porta et al. 2017). Cependant, leur profil immunosuppresseur étant moins favorable, ils ne sont pas utilisés en première intention car ils ont été associés à un risque de rejet plus important (Lebranchu et al. 2009). Dans ce contexte, le génotypage du *VEGF* et des *VEGFR* semble prometteur. Des applications concernant le dépistage pourraient également être envisagées. Les patients ayant un génotype à risque pourraient bénéficier d'une surveillance échographique plus fréquente afin de garantir un diagnostic le plus précoce possible.

IV. Hypothèses de travail et objectifs

Dans une première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'impact de la CsA sur la protéostase. L'intégrité du compartiment de sécrétion étant essentielle au fonctionnement des cellules eucaryotes, nous avons formulé l'hypothèse que l'altération de la protéostase liée à une exposition chronique des tissus à la CsA pourrait conduire à une activation de l'UPR qui favoriserait l'agressivité des tumeurs. Nous avons supposé que ces mécanismes pourraient participer à la régulation de la production du VEGF dans le RCC post-transplantation. Concernant cette problématique, nos objectifs étaient :

- de confirmer l'impact de la CsA sur la régulation des protéines sécrétées en portant un intérêt particulier à la régulation du VEGF ; d'explorer l'implication de l'UPR et d'envisager son ciblage.

- de sélectionner une liste de biomarqueurs de l'UPR qui permettraient d'examiner de façon plus approfondie l'impact de la CsA sur la protéostase et l'UPR chez des patients transplantés ayant développé un RCC.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié un aspect de l'hétérogénéité de réponse aux stimuli pro-angiogéniques dans le RCC post-transplantation. Le *VEGF* est un gène polymorphe avec de nombreux SNP décrits dont certains peuvent avoir un impact sur l'expression du VEGF. Nous avons formulé l'hypothèse que certains polymorphismes du *VEGF* et des *VEGFR* pourraient favoriser la progression ou l'agressivité du RCC post-transplantation. Dans ce contexte, notre objectif était :

- d'explorer l'impact de polymorphismes candidats du *VEGF* et des *VEGFR* dans la progression ou l'agressivité du RCC post-transplantation dans une cohorte de patients transplantés rénaux.

Ces objectifs sont abordés dans le chapitre des travaux personnels dans les parties I, II et III.

Chapitre II : Travaux personnels

I. Article 1 : Intérêt du ciblage de l'UPR dans le RCC post-transplantation

Cet article porte sur l'étude de l'impact de la CsA sur la protéostase dans 3 lignées cellulaires de RCC et propose une évaluation de l'intérêt du ciblage de l'UPR dans le RCC post-transplantation. Il a été publié dans la revue *Anticancer Research* :

Anticancer Research. 2017, 37: p1049-1058

Targeting the Unfolded Protein Response as a Potential Therapeutic Strategy in Renal Carcinoma Cells Exposed to Cyclosporine A

S. Bodeau, C. Sauzay, R. Nyga, C. Louandre, V. Descamps, C. François, C. godin,
G. Choukroun and A. Galmiche

Targeting the Unfolded Protein Response as a Potential Therapeutic Strategy in Renal Carcinoma Cells Exposed to Cyclosporine A

SANDRA BODEAU^{1,2}, CHLOÉ SAUZAY^{3,4}, RÉMY NYGA³, CHRISTOPHE LOUANDRE³,
VÉRONIQUE DESCAMPS⁵, CATHERINE FRANÇOIS⁵, CORINNE GODIN^{3,4},
GABRIEL CHOUKROUN^{2,6} and ANTOINE GALMICHE^{3,4}

¹Department of Pharmacology and Toxicology, Amiens University Hospital, Amiens, France;

²Inserm U1088, University of Picardie Jules Verne, Amiens, France;

³Department of Biochemistry, Amiens University Hospital, Amiens, France;

⁴EA4666, University of Picardie Jules Verne, Amiens, France;

⁵EA4294, University of Picardie Jules Verne, Amiens, France;

⁶Department of Nephrology, Amiens University Hospital, Amiens, France

Abstract. *Background/Aim:* Organ transplant patients treated with the immunosuppressive drug cyclosporine A often present malignant kidney tumors. Cyclosporine A can promote oncogenesis in a cell-intrinsic manner by increasing the production of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Materials and Methods:* We explored the impact of cyclosporine A and the role of the unfolded protein response (UPR) on three human renal cell carcinoma (RCC) cell lines under normoxic and hypoxic (1% O₂) conditions. *Results:* Cyclosporine A regulated the expression of VEGF at the post-transcriptional level. Cyclosporine A induced the inositol requiring enzyme-1 α (IRE1 α) arm of the UPR and stabilized neosynthesized proteins in RCC cells. Toyocamycin, an inhibitor of IRE1 α , abolished the clonogenic growth of RCC cells and reduced induction of VEGF by cyclosporine A under hypoxia. *Conclusion:* Our findings highlight the impact of cyclosporine A on the proteostasis of RCC cells, and suggest the potential therapeutic interest of targeting the UPR against tumors arising in the context of organ transplantation.

Cyclosporine A is one of the most frequently used immunosuppressive drugs following organ transplantation.

Correspondence to: Antoine Galmiche, MD, Ph.D., Laboratoire de Biochimie, Centre de Biologie Humaine (CBH), CHU Amiens Sud, Avenue Laennec, 80054 Amiens Cedex, France. Tel: +33 0322087017, Fax: +33 0322087026, e-mail: Galmiche.Antoine@chu-amiens.fr

Key Words: Cyclosporine A, renal cell carcinoma, unfolded protein response, vascular endothelial growth factor, toyocamycin.

Cyclosporine A prevents acute rejection of the transplanted organ by its recipient. However, long-term complications, including various types of malignancy, are emerging as a factor limiting patient survival (1, 2). Malignant tumors, in particular those originating from the kidney, occur with a five-fold increased frequency in organ transplant patients (1). The mechanisms that promote the appearance of malignant kidney tumors, in particular renal cell carcinoma (RCC), under immunosuppressive treatment are complex and probably multifactorial. Several studies indicate that cyclosporine A promotes pro-tumorigenic signaling in a cell-intrinsic manner in RCC cells (3, 4). Vascular endothelial growth factor (VEGF) produced by RCC cells is a possible actor in cyclosporine A-induced carcinogenesis, since cyclosporine A increases its expression in RCC cells (5). VEGF is usually regarded as an essential growth factor in RCC, considering that these tumors are highly vascular and that multiple alterations of angiogenic signaling are found in RCC (6-8). In addition to controlling tumor angiogenesis, VEGF is implicated in autocrine/paracrine signaling in RCC cells (9, 10). The clinical efficacy of sunitinib, an inhibitor directed against the VEGF receptor, constitutes further proof that the VEGF receptor is an essential actor in renal carcinogenesis (11).

While VEGF is likely an important factor and a target for the treatment of RCC, it is still unclear how RCC cells regulate the production of VEGF upon exposure to cyclosporine A. Early studies suggested the possible importance of transcription in the regulation of VEGF expression (5). These findings were challenged by other studies which reported that post-transcriptional mechanisms account for most of the regulation of VEGF production (12, 13). Recently, cyclosporine A was also found to interfere

with the functionality of the secretory compartment of eukaryotic cells (14, 15). For example, by interacting with cyclophilin B, a member of the cyclophilin family of proteins present in the endoplasmic reticulum (ER) of eukaryotic cells, cyclosporine A interferes with the folding and the turn-over of secreted proteins (14, 15). The possibility that cyclosporine A interferes with cellular proteostasis, *i.e.* the biogenesis, folding, trafficking and degradation of proteins within eukaryotic cell, has not yet directly been addressed in RCC cells.

The unfolded protein response (UPR) is a homeostatic mechanism that regulates the functionality of the secretion apparatus of eukaryotic cells (16-18). The UPR consists of three transduction cascades that are activated under conditions of ER stress, and that are each regulated by a distinct protein sensor: i) Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) is able to phosphorylate the eukaryotic translation initiation factor-2 α (eIF2 α) and control global protein synthesis; ii) Inositol-requiring enzyme-1 α (IRE1 α) is a nuclease reported to catalyze the unconventional splicing of the mRNA encoding the X-box binding protein-1 (XBP1) to produce a splice variant of this transcription factor, sXBP1. iii) Activating transcription factor-6 (ATF6) regulates the expression of specific genes. Interestingly, the activated IRE-1 α and PERK arms of the UPR were found to exert a positive regulatory effect on the expression of VEGF in multiple experimental systems, although to our knowledge no study was devoted to RCC (13, 19-22). In the present study, we aimed to address the potential impact of cyclosporine A on the proteostasis of RCC cells and to test whether the UPR represents a valid therapeutic target in RCC.

Materials and Methods

Cell culture and reagents. The three human RCC cell lines used in this study were ACHN (ATCC-CRL-1611), Caki-1 (ATCC-HTB-46) and 786-O (ATCC-CRL-1932), and were purchased from American Type Culture Collection (LGC standards, Strasbourg, France). Hypoxic conditions were obtained by placing cells in a hypoxic chamber with 1% O₂ (Sanyo, Roissy, France). GSK2606414, puromycin and tunicamycin were purchased from Calbiochem. Tacrolimus and all other reagents were purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France).

Determination of VEGF levels. VEGF and amphiregulin (AREG) concentrations in the cell culture medium were measured with an ELISA kit purchased from R&D systems (Lille, France) (for VEGF, limit of detection <5 pg/ml, limit of quantification <15.6 pg/ml; for AREG, limit of detection <1.4 pg/ml, limit of quantification <15.6 pg/ml). Both kits were used according to the manufacturer's instructions.

Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR). Total RNA was extracted using RN-Easy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France)

and reverse-transcribed using High Capacity cDNA Reverse Transcription kit and random hexamer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Amplification was performed with the TaqMan Universal PCR master Mix (Applied Biosystems) on an ABI 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) using primers and probe sets for *VEGFA* and glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) (TaqMan Gene Expression Assay; Applied Biosystems).

Determination of VEGFA promoter activity. The DNA construct covering the human VEGFA promoter inserted in the vector pGL3, encoding firefly (*Photinus pyralis*) luciferase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) was previously reported by Miyagi *et al.* (23). Cells were transfected using the Genjet reagent, as indicated by the provider (Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France). Lysis was performed using appropriate reagents from Promega, and luciferase activity was measured on a CentroLB 960 Microplate Luminometer (Berthold, Thoiry, France).

RNA interference. Small interfering RNA (siRNA) directed against XBP1 (references S14915 and S14913, both from Applied Biosystems) were transfected using the siPORT-NeoFX reagent (Invitrogen, Courtaboeuf, France) and Opti-MEM transfection medium (Life Technologies, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions.

Labelling of neosynthesized proteins with low doses of puromycin. The incorporation of puromycin into nascent proteins and its subsequent detection with a monoclonal antibody directed against puromycin were previously reported by Schmidt *et al.* (24). Briefly, cells were exposed to 10 μ g/ml puromycin for 10 min. Cycloheximide, an antibiotic that blocks protein synthesis in eukaryotic cells, was used as a negative control and applied 30 min before exposure to puromycin at a concentration of 50 μ M. Puromycinylated proteins were detected by immunoblot analysis.

Immunoblotting. Complete cell extracts were transferred to nitrocellulose membranes using standard procedures. The ECL reaction was used to reveal protein. Rabbit antibodies directed against sXBP1, glucose-regulated protein-78 (GRP78), eIF2 α and its phosphorylated form (p-eIF2 α) were from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Mouse anti-puromycin (MABE 343) was purchased from Merk Millipore (Saint Quentin en Yvelines, France). Rabbit anti-oxygen-regulated protein-150 (ORP150) was from Abcam (Cambridge, UK). Mouse anti- β -actin was obtained from Sigma. Secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase were purchased from GE Healthcare.

Clonogenicity assay. Clonogenic growth was measured as previously described (25). Briefly, 200 viable RCC cells were seeded per well of 15 mm diameter. Cells were allowed to adhere overnight, and later exposed to cyclosporine A. After 10 days of culture, the clones were stained with Giemsa and a blind count was performed.

Statistical analyses. Student's *t*-test was used for comparison between groups and a value of $p < 0.05$ was considered as threshold for significance. Immunoblots were scanned and quantified using the software Image J (National Institute of Health, USA).

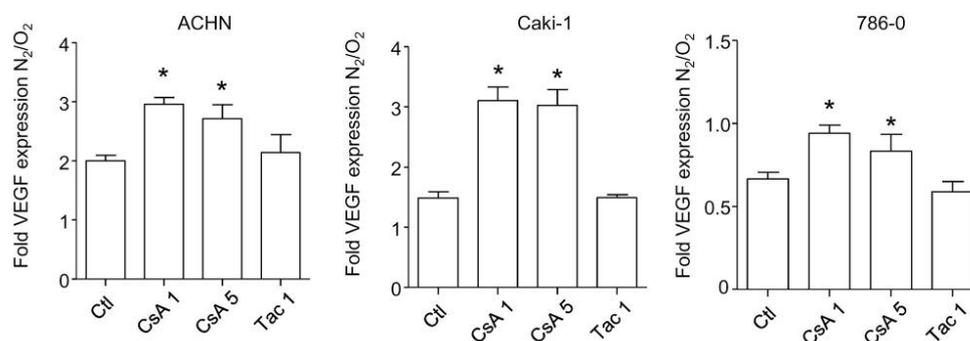


Figure 1. Cyclosporine A (CsA) increases vascular endothelial growth factor (VEGF) production by renal carcinoma cells (RCC) under hypoxic conditions. The indicated RCC cell lines were exposed to cyclosporine A (1 and 5 μ M) and tacrolimus (Tac; 1 μ M) under normoxic and hypoxic conditions (1% O₂). VEGF production was determined in cell culture supernatants after 18 h at these conditions. Fold induction of VEGF concentrations measured in hypoxic over normoxic conditions was calculated. *Statistically significantly different at $p < 0.05$ compared to the control. The results are from a representative experiment performed in triplicate.

Results

Cyclosporine A increases VEGF production by RCC cells under hypoxic conditions. In order to examine the impact of cyclosporine A on RCC cells, we exposed three RCC cell lines with different genetic backgrounds to cyclosporine A (1 and 5 μ M) and tacrolimus (1 μ M) *in vitro*. Cells were maintained for 18 h in normoxic and hypoxic conditions (1% O₂) and cell culture supernatants were collected and analyzed by ELISA to determine VEGF production (Figure 1). Hypoxic induction of VEGF was found in all three RCC cell lines, although the induction was more pronounced in Caki-1 cells. Cyclosporine A increased the hypoxic induction of VEGF, while no induction of VEGF was apparent with tacrolimus (Figure 1). Under our conditions, cyclosporine A did not modulate the activation levels of the main oncogenic kinase cascades: protein kinase B (PKB)-mammalian target of rapamycin (mTOR) or extracellular signal-regulated kinases (ERK) (data not shown). The transcription factor hypoxia-inducible factor-2 α (HIF2 α), the main inducible isoform of HIF that we detected under our experimental conditions, was induced to the same extent in RCC cells irrespective of their exposure to cyclosporine A (data not shown). We analyzed the VEGFA mRNA levels and the activity of the corresponding promoter in Caki-1 cells (Figure 2). Hypoxic conditions induced a clear increase in the expression of VEGFA mRNA, but cyclosporine A had no clear effect on this parameter (Figure 2A). The promoter activity of VEGFA was also studied with a construct encompassing the 6-kb region located upstream of the translation initiation site (Figure 2B). The activity of the

VEGFA promoter was induced by more than 15-fold by hypoxia, but cyclosporine A exerted no further stimulation on its promoter activity (Figure 2B). These findings indicate that cyclosporine A mostly influenced the production of VEGF through post-transcriptional mechanisms in our experimental setting.

Cyclosporine A activates the IRE1 α arm of the UPR in RCC cells. In order to explore the possible regulatory role of the UPR in the transcriptional regulation of VEGF expression, we examined the activity of the three arms of the UPR (IRE-1 α , PERK and ATF6) in Caki-1 cells exposed to cyclosporine A (Figure 3A). We monitored the appearance of the spliced form of XBP1 as a marker of IRE1 α activation, the phosphorylation status of the eIF2 α on Ser51, which reflects the activity of the kinase PERK, and the levels of the chaperones GRP78 and ORP150, whose expression is under transcriptional control by ATF6 (26). We observed that cyclosporine A induced the activation of the IRE-1 α arm of the UPR, yet to a lesser extent under hypoxic than normoxic conditions (Figure 3A). We decided to explore the potential significance of sXBP1 because this transcription factor had previously been shown to regulate the transcriptome of cancer cells under hypoxic conditions (22). Two independent siRNAs targeting XBP1 were used, which prevented the appearance of sXBP1 upon tunicamycin exposure (Figure 3B). Neither had a detectable effect on the VEGFA mRNA level in Caki-1 cells exposed to hypoxic conditions and cyclosporine A (Figure 3C), suggesting that the UPR is not an essential regulator of VEGFA transcription in this situation.

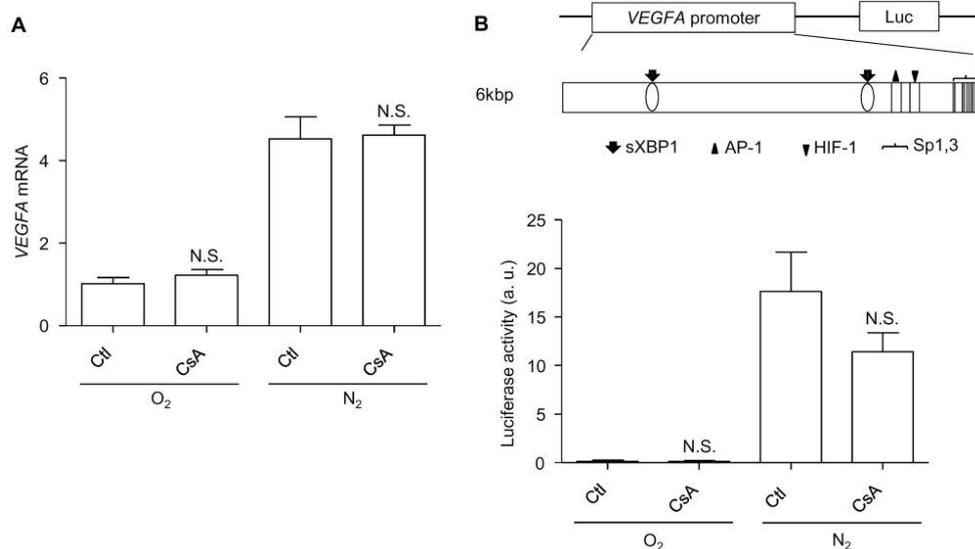


Figure 2. Cyclosporine A (CsA) predominantly regulates vascular endothelial growth factor A (VEGFA) expression post-transcriptionally. A: Quantitative analysis of VEGFA mRNA level in Caki-1 cells. The VEGFA mRNA level was analyzed in Caki-1 cells exposed to cyclosporine A (1 μ M) under normoxic and hypoxic conditions (1% O₂) for 18 h. Results are from an experiment performed in triplicate. The VEGFA mRNA levels were normalized to those of glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (GAPDH), taking the control condition (Ctl) as reference. B: Luciferase activity for the analysis of the promoter of VEGFA. A construct encompassing the 6-kbp region located upstream of the translation initiation site was transfected into Caki-1 cells, exposed to cyclosporine A in normoxic and hypoxic conditions for 18 h. The upper panel contains a graphical description of the VEGFA promoter, including the localization of the binding sites for the following important transcription factors: XBP1: X-box binding protein-1; AP1: Activator Protein 1; HIF1: Hypoxia-Inducible Factor; SP1 and SP3 transcription factors. N.S: Lack of significant difference compared to cells under the same conditions treated with cyclosporine A.

Cyclosporine A alters the nascent proteome of RCC cells. In an attempt to examine the effect of cyclosporine A on the secretion of proteins other than VEGF, we tested the effect of cyclosporine A on the production of other growth factors produced in the culture supernatants of RCC cells. Interestingly, cyclosporine A increased the amount of AREG produced by Caki-1 cells under hypoxic conditions in a manner that was reminiscent of the effect observed with VEGF (data not shown). This suggests that cyclosporine A exerts a general effect on tumor cell proteostasis rather than a specific regulatory effect on the transcription of VEGF. In order to explore the regulation of the nascent proteome in RCC cells, we used a technique that relies on the incorporation of low concentrations of puromycin into nascent proteins (24). Cells exposed to different culture conditions were labelled with puromycin for a short interval of time. Cellular extracts were prepared and puromycinylated proteins were analyzed by immunoblotting (24). Interestingly, cyclosporine A increased the overall levels of

puromycinylated proteins by almost two-fold in RCC cells under normoxic and hypoxic conditions, revealing a broad effect of cyclosporine A on the nascent proteome of RCC cells (Figure 4A and B). This effect was found in all RCC cell lines tested (data not shown), and was also specific to cyclosporine A, since tacrolimus did not show such activity (Figure 4C). We noticed an apparent inverse correlation between the level of puromycinylated proteins and the induction of the sXBP1 previously observed (Figure 3). This observation suggests the possibility that the effect of cyclosporine A on the nascent proteome is a possible explanation for the induction of the UPR.

Targeting the IRE1 α arm of the UPR in RCC cells. Based on the observations that cyclosporine A activates the IRE1 α arm of the UPR, we decided to explore the effects of two chemical inhibitors of the UPR on RCC cells, namely toyocamycin, a compound produced by some *Actinomycete* strains and recently reported to inhibit IRE-1 α -dependent RNase activity

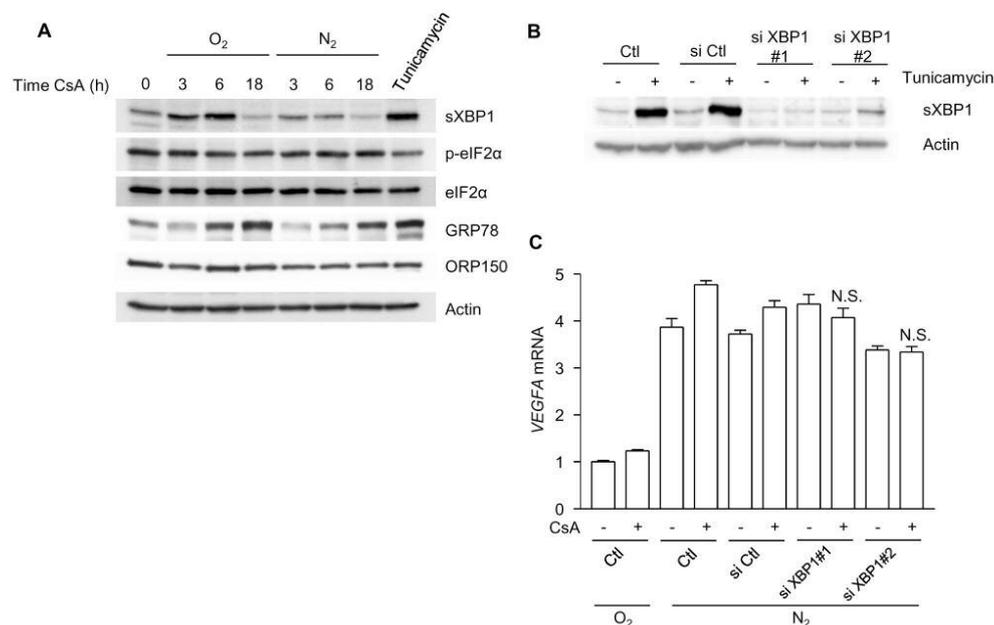


Figure 3. Cyclosporine A (CsA) activates the inositol requiring enzyme-1 α (IRE1 α) arm of the unfolded protein response in renal cancer cells. *A:* Protein extracts were prepared from Caki-1 cells exposed to cyclosporine A for the indicated time under normoxic and hypoxic conditions, and various UPR markers were analyzed by immunoblotting. Tunicamycin was used as an inducer of endoplasmic reticulum stress and was applied at a concentration of 10 μ M for 6 h. *B:* Caki-1 cells were transfected with two siRNAs targeting distinct regions of X-box binding protein-1 (XBP1), and exposed to tunicamycin (10 μ M) for 6 h. An immunoblot analysis was subsequently performed using an antibody to XBP1, revealing a more than 95% inhibition of the knock-down. *C:* Caki-1 cells were treated as indicated in panel B and exposed to cyclosporine A (1 μ M) under normoxic and hypoxic conditions for 18 h. The level of VEGFA mRNA was measured and normalized to glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (GAPDH), taking the control condition (Ctl) as reference. N.S.: Lack of significant difference compared to the same conditions with control siRNA.

(27, 28); and GSK2606414, a chemical blocker of the kinase PERK (29). Both inhibitors were applied at a concentration of 1 μ M, shown to inhibit their respective targets (Figure 5A and B) without exerting a direct short-term cytotoxic effect as single agents (data not shown). While GSK2606414 displayed no significant effect on the amount of VEGF produced in the cell culture medium of Caki-1 cells, toyocamycin dramatically reduced the amount of VEGF produced in hypoxic cells exposed to cyclosporine A (Figure 5C). We explored the anti-oncogenic efficacy of toyocamycin with a clonogenic growth assay (Figure 6). A combination of cyclosporine A and toyocamycin radically prevented the clonogenic growth of Caki-1 cells. The clonogenic growth of 786-O and ACHN cells was inhibited upon the application of toyocamycin as a single agent (Figure 6). The findings suggest that the IRE1 α arm of the UPR may be a potential therapeutic target in RCC cells, especially upon exposure to cyclosporine A.

Discussion

Cyclosporine A, a calcineurin inhibitor that is widely used to prevent organ rejection, increases the production of VEGF and sustains malignant transformation of RCC cells in a cell-intrinsic manner (3, 4). We explored the impact of cyclosporine A on RCC cells with a focus on the UPR and the regulation of VEGF. We observed that cyclosporine A essentially activates the IRE1 α arm of the UPR, and explored the consequences of its pharmacological targeting by applying the inhibitor toyocamycin (27, 28). In Caki-1 cells, toyocamycin prevented the boost in VEGF production induced by cyclosporine A under hypoxic conditions. In the RCC cell lines tested here, toyocamycin exerted a strong anti-oncogenic activity, both as a single agent and in combination with cyclosporine A. The present study, therefore, highlights the broad impact of cyclosporine A on

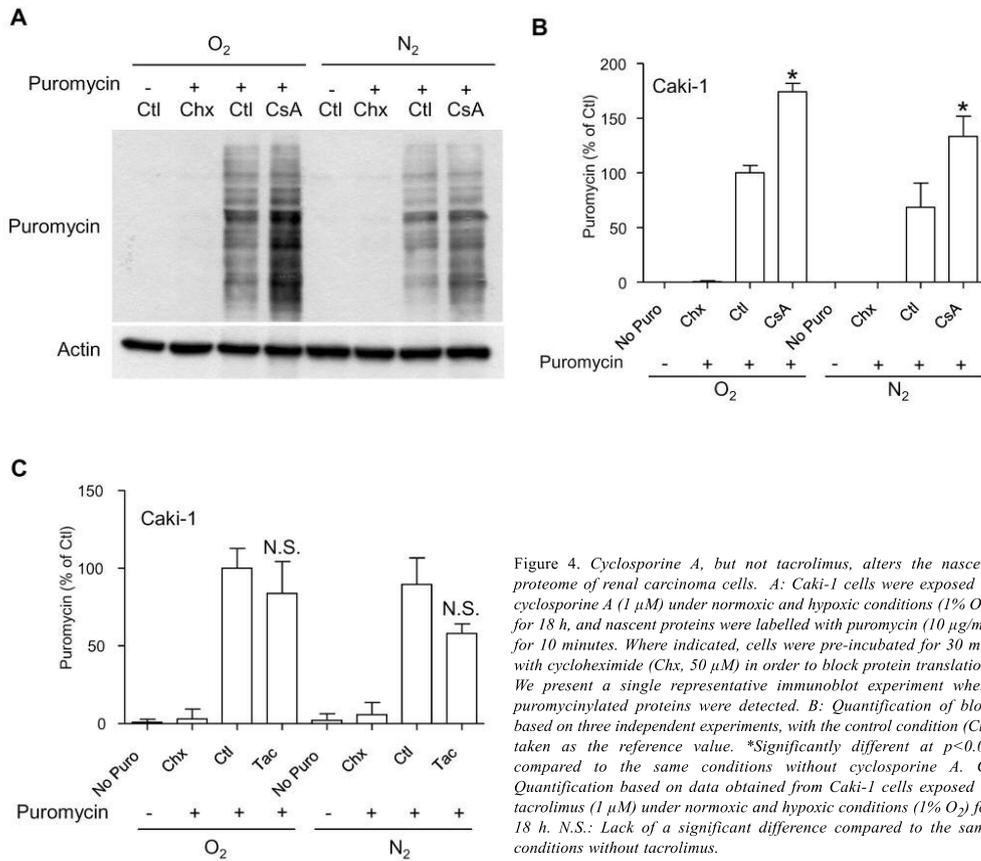


Figure 4. Cyclosporine A, but not tacrolimus, alters the nascent proteome of renal carcinoma cells. **A:** Caki-1 cells were exposed to cyclosporine A (1 μ M) under normoxic and hypoxic conditions (1% O₂) for 18 h, and nascent proteins were labelled with puromycin (10 μ g/ml) for 10 minutes. Where indicated, cells were pre-incubated for 30 min with cycloheximide (Chx, 50 μ M) in order to block protein translation. We present a single representative immunoblot experiment where puromycinylated proteins were detected. **B:** Quantification of blots based on three independent experiments, with the control condition (Ctl) taken as the reference value. *Significantly different at $p < 0.05$ compared to the same conditions without cyclosporine A. **C:** Quantification based on data obtained from Caki-1 cells exposed to tacrolimus (1 μ M) under normoxic and hypoxic conditions (1% O₂) for 18 h. N.S.: Lack of a significant difference compared to the same conditions without tacrolimus.

the proteostasis of RCC cells and suggests, as far as we are aware, for the first time that the UPR might be a potentially interesting target in therapy against these tumors.

The present study aimed to explore the possibility that RCC cells might differ in their response to cyclosporine A. The three RCC cell lines used in this study were chosen because their mutational status differs at the level of three essential oncogenes reported to play a role in renal carcinogenesis (the genes *TP53*, *PTEN* and *VHL*). Interestingly, we found that the effect of cyclosporine A on VEGF was relatively independent of the genotype of the RCC cell line examined. Cyclosporine A increased the secretion of VEGF and exerted comparable effect on the nascent proteome in all three RCC cells. The present findings do not rule-out the possible contribution of

individual genomic polymorphisms to the control of VEGF production in RCC cells. Nevertheless, the observation that cyclosporine A had an effect on RCC cells with different genomic backgrounds is in agreement with the presumed mode of action of cyclosporine A on tumor proteostasis, and with the notion that cyclosporine A targets conserved actors of proteostasis, such as cyclophilin B in the secretory compartment (14). More studies are required to examine the regulation of the UPR in different RCC cells, but the UPR is emerging as a central regulator of human tumorigenesis (16). Core actors of the UPR, such as IRE1 α , might constitute functionally important and relatively well-conserved targets among tumors arising in a context of proteostasis disturbance induced by chronic exposure to cyclosporine A.

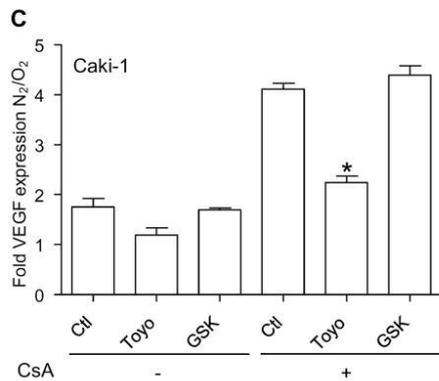
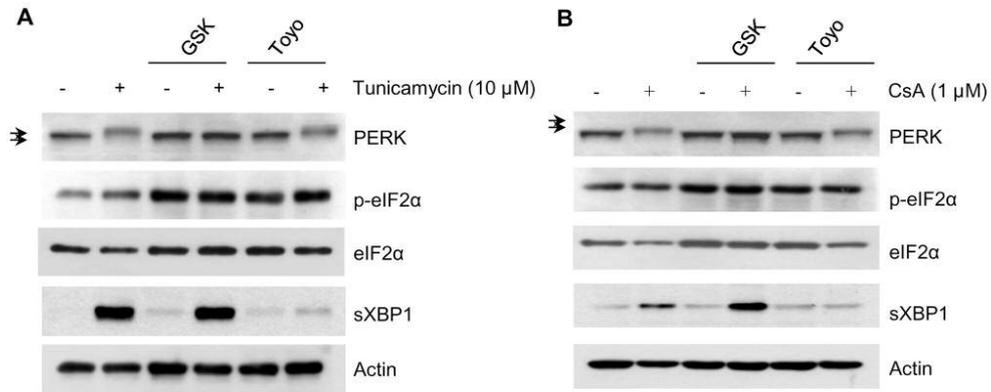


Figure 5. *In vitro* study of the effects of chemical inhibitors of the unfolded protein response in renal carcinoma cells exposed to cyclosporine A (CsA). **A**: The chemical inhibitors toyocamycin (Toyo; 1 μM) and GSK2606414 (GSK; 1 μM), directed against inositol requiring enzyme-1α (IRE1α) RNase activity and the protein kinase R-like ER kinase (PERK), respectively, were applied 30 min before tunicamycin (10 μM, 6 h) and the indicated markers were analyzed by immunoblot. The arrows indicate the existence of a mobility shift applying to PERK in conditions of endoplasmic reticulum stress and prevented by GSK2606414. **B**: Toyocamycin (1 μM) and GSK2606414 (1 μM) were applied 30 min before cyclosporine A (1 μM, 6 h) and the indicated markers were analyzed by immunoblot. **C**: Caki-1 cells were exposed to cyclosporine A (1 μM), toyocamycin (1 μM) and GSK2606414 (1 μM), applied as indicated under normoxic or hypoxic conditions (1% O₂), and vascular endothelial growth factor (VEGF) production was determined in cell culture supernatants after 18 h. Results are presented as a fold induction of VEGF measured under hypoxic over normoxic conditions. *Significantly different at $p < 0.05$ compared to equivalent conditions without toyocamycin or GSK2606414.

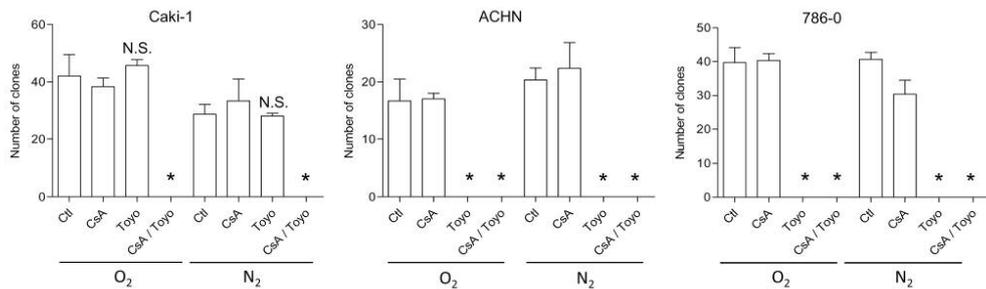


Figure 6. Clonogenic growth of renal carcinoma cells exposed to cyclosporine A (CsA) and toyocamycin (Toyo). The clonogenic growth of each RCC cell line was measured upon exposure to cyclosporine A (1 μM) and toyocamycin (1 μM), applied as indicated under normoxic or hypoxic conditions (1% O₂). The results are from a representative experiment performed in triplicate. Ctl: Control. *Significantly different at $p < 0.05$ compared to conditions with CsA alone.

Additional studies are required to explore the role and the regulation of the UPR in RCC occurring after organ transplantation. In this respect, an obvious limitation of our study is its experimental set up based on the *in vitro* exposure of RCC cells to cyclosporine A. In order to explore the potential of the UPR as a therapeutic target in cyclosporine A-associated carcinogenesis in a more relevant manner, future investigations should be centered on human tumor samples. These studies should explore the impact of cyclosporine A on the proteostasis of cancer cells, with a focus on ER chaperones and the IRE1 α arm of the UPR. Based on our *in vitro* results, we propose that the study of tumor proteostasis offers promising medical perspectives for post-transplant RCC.

Conflicts of Interest

The Authors have not declared any conflict of interest.

Acknowledgements

The Authors thank Dr. Zuzana Saidak for helpful comments on the draft. We are grateful for financial support received from Association Santelys, Ligue contre le Cancer, comité de la Somme, and CHU Amiens.

References

- Engels EA, Pfeiffer RM, Fraumeni JF Jr, Kasiske BL, Israni AK, Snyder JJ, Wolfe RA, Goodrich NP, Bayakly AR, Clarke CA, Copeland G, Finch JL, Fleissner ML, Goodman MT, Kahn A, Koch L, Lynch CF, Madeleine MM, Pawlish K, Rao C, Williams MA, Castenson D, Curry M, Parsons R, Fant G and Lin M: Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA* 306: 1891-1901, 2011.
- Wong G and Chapman JR: Cancers after renal transplantation. *Transplant Rev* 22: 141-149, 2008.
- Datta D, Contreras AG, Basu A, Dormond O, Flynn E, Briscoe DM and Pal S: Calcineurin inhibitors activate the proto-oncogene Ras and promote protumorigenic signals in renal cancer cells. *Cancer Res* 69: 8902-8909, 2009.
- Basu A, Banerjee P, Contreras AG, Flynn E and Pal S: Calcineurin inhibitor-induced and RAS-mediated overexpression of VEGF in renal cancer cells involves mTOR through the regulation of PRAS40. *PLoS One* 6: e23919, 2011.
- Basu A, Contreras AG, Datta D, Flynn E, Zeng L, Cohen HT, Briscoe DM and Pal S: Overexpression of vascular endothelial growth factor and the development of post-transplantation cancer. *Cancer Res* 68: 5689-5698, 2008.
- Cohen HT and McGovern FJ: Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 353: 2477-2490, 2005.
- Rosa R, Damiano V, Nappi L, Formisano L, Massari F, Scarpa A, Martignoni G, Bianco R and Tortora G: Angiogenic and signalling proteins correlate with sensitivity to sequential treatment in renal cell cancer. *Br J Cancer* 109: 686-693, 2013.
- Funakoshi T, Lee CH and Hsieh JJ: A systematic review of predictive and prognostic biomarkers for VEGF-targeted therapy in renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev* 40: 533-547, 2014.
- Goel HL and Mercurio AM: VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer* 13: 871-882, 2013.
- Villegas G, Lange-Sperandio B and Tufro A: Autocrine and paracrine functions of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 67: 449-457, 2005.
- Oudard S, Beuselink B, Decoene J and Albers P: Sunitinib for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev* 37: 178-184, 2011.
- Basu A, Datta D, Zurakowski D and Pal S: Altered VEGF mRNA stability following treatments with immunosuppressive agents: implications for cancer development. *J Biol Chem* 285: 25196-25202, 2010.
- Philippe C, Dubrac A, Quelen C, Desquesnes A, Van Den Berghe L, Ségura C, Filleron T, Pyronnet S, Prats H, Brousset P and Touriol C: PERK mediates the IRES-dependent translational activation of mRNAs encoding angiogenic growth factors after ischemic stress. *Sci Signal* 9: ra44, 2016.
- Bernasconi R, Soldà T, Galli C, Pertel T, Luban J and Molinari M: Cyclosporine A-sensitive, cyclophilin B-dependent endoplasmic reticulum-associated degradation. *PLoS One* 5: e13008, 2010.
- Lamoureux F, Gastinel LN, Mestre E, Marquet P and Essig M: Mapping cyclosporine-induced changes in protein secretion by renal cells using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). *J Proteomics* 75: 3674-3687, 2012.
- Urta H, Dufey E, Avril T, Chevet E and Hetz C: Endoplasmic reticulum stress and the hallmarks of cancer. *Trends Cancer* 2: 252-262, 2016.
- Hetz C, Chevet E and Oakes SA: Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat Cell Biol* 17: 829-838, 2015.
- Chevet E, Hetz C and Samali A: Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer Discov* 5: 586-597, 2015.
- Drogat B, Auguste P, Nguyen DT, Boucheccareilh M, Pineau R, Nalbantoglu J, Kaufman RJ, Chevet E, Bikfalvi A and Moenner M: IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *Cancer Res* 67: 6700-6707, 2007.
- Auf G, Jabouille A, Guérit S, Pineau R, Delugin M, Boucheccareilh M, Magnin N, Favereaux A, Maitre M, Gaiser T, von Deimling A, Czabanka M, Vajkoczy P, Chevet E, Bikfalvi A and Moenner M: Inositol-requiring enzyme 1 α is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 15553-15558, 2010.
- Ghosh R, Lipson KL, Sargent KE, Mercurio AM, Hunt JS, Ron D and Urano F: Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PLoS One* 5: e9575, 2010.
- Chen X, Iliopoulos D, Zhang Q, Tang Q, Greenblatt MB, Hatziaepostolou M, Lim E, Tam WL, Ni M, Chen Y, Mai J, Shen H, Hu DZ, Adoro S, Hu B, Song M, Tan C, Landis MD, Ferrari M, Shin SJ, Brown M, Chang JC, Liu XS and Glimcher LH: XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature* 508: 103-107, 2014.
- Miyagi H, Kanemoto S, Saito A, Asada R, Iwamoto H, Izumi S, Kido M, Gomi F, Nishida K, Kiuchi Y and Imaizumi K: Transcriptional regulation of VEGFA by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS in ARPE-19 cells. *PLoS One* 8: e55155, 2013.

- 24 Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M and Pierre P: SUNSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods* 6: 275-277, 2009.
- 25 Galmiche A, Ezzoukry Z, François C, Louandre C, Sabbagh C, Nguyen-Khac E, Descamps V, Trouillet N, Godin C, Regimbeau JM, Joly JP, Barbare JC, Duverlie G, Mazière JC and Chatelain D: BAD, a proapoptotic member of the BCL2 family, is a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Res* 8: 1116-1125, 2010.
- 26 Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T and Mori K: Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* 273: 33741-33749, 1998.
- 27 Ri M, Tashiro E, Oikawa D, Shinjo S, Tokuda M, Yokouchi Y, Narita T, Masaki A, Ito A, Ding J, Kusumoto S, Ishida T, Komatsu H, Shiotsu Y, Ueda R, Iwawaki T, Imoto M and Iida S: Identification of Toyocamycin, an agent cytotoxic for multiple myeloma cells, as a potent inhibitor of ER stress-induced *XBP1* mRNA splicing. *Blood Cancer J* 2: e79, 2012.
- 28 Houesson A, Gicquel A, Bochereau F, Louandre C, Nyga R, Godin C, Degonville J, Fournier E, Saidak Z, Drullion C, Barbare JC, Chauffert B, François C, Pluquet O and Galmiche A: Alpha-fetoprotein is a biomarker of unfolded protein response and altered proteostasis in hepatocellular carcinoma cells exposed to sorafenib. *Cancer Lett* 370: 242-249, 2016.
- 29 Axten JM, Medina JR, Feng Y, Shu A, Romeril SP, Grant SW, Li WH, Heerding DA, Minthorn E, Mencken T, Atkins C, Liu Q, Rabindran S, Kumar R, Hong X, Goetz A, Stanley T, Taylor JD, Sigethy SD, Tomberlin GH, Hassell AM, Kahler KM, Shewchuk LM and Gampe RT: Discovery of 7-methyl-5-(1-([3-(trifluoromethyl)phenyl]acetyl)-2,3-dihydro-1*H*-indol-5-yl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a potent and selective first-in-class inhibitor of protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). *J Med Chem* 55: 7193-7207, 2012.

Received January 3, 2017

Revised February 7, 2017

Accepted February 14, 2017

II. Article 2 : Recherche de nouveaux biomarqueurs de l'UPR dans les cancers post-transplantation

Dans le deuxième article, nous évaluons le rôle que pourrait occuper la protéostase dans la progression et l'agressivité des cancers post-transplantation en portant un intérêt particulier au RCC post-transplantation. Nous proposons une sélection de biomarqueurs de l'UPR qui permettraient d'examiner de façon plus approfondie l'impact de la CsA sur la protéostase et l'UPR chez des patients transplantés ayant développé un RCC. Cet article est en révision dans la revue *Clinical Science* :

A potential role of the Unfolded Protein Response in post-transplant cancer

S. Bodeau, C. Sauzay, O. Pluquet, G. Choukroun, A. Galmiche

Accepté pour publication dans la revue *Clinical Science*.

A potential role of the Unfolded Protein Response in post-transplant cancer

Sandra Bodeau^{1,2,7}, Chloé Sauzay^{3,4,7}, Olivier Pluquet⁵,

Gabriel Choukroun^{6,2}, Antoine Galmiche^{3,4,8}

1: Service de Pharmacologie, Centre de Biologie Humaine (CBH), CHU Amiens Sud

2: Inserm U1088, Faculté de Médecine, Université de Picardie Jules Verne

3: Service de Biochimie, Centre de Biologie Humaine (CBH), CHU Amiens Sud

4 : EA4666, Faculté de Médecine, Université de Picardie Jules Verne

5: Université de Lille, Institut Pasteur de Lille, CNRS UMR8161, M3T : Mechanisms of tumorigenesis and targeted therapies, Lille, France

6: Service de Néphrologie, CHU Amiens Sud

7: Sandra Bodeau and Chloé Sauzay share first authorship

8: Corresponding author: Antoine Galmiche, MD PhD, Laboratoire de Biochimie, Centre de Biologie Humaine (CBH), CHU Amiens Sud, Avenue Laennec, 80054 Amiens Cedex, France. Tel: 033-(0)322087017; Fax: 033-(0)322087059; E-mail: Galmiche.Antoine@chu-amiens.fr

Running Title: Post-transplant cancer and the UPR

Key words: Post-transplant cancer; Cyclosporin A; Unfolded Protein Response; biomarkers

List of abbreviations: CNI: Calcineurin inhibitors ; CsA: Cyclosporin A ; CyP: Cyclophilins; ER: endoplasmic reticulum ; ERAD: ER-associated degradation ; MPTP: Mitochondrial permeability transition pore ; PPIase:peptidyl-prolyl cis-trans isomerase; RCC: renal cell carcinoma ; UPR : Unfolded Protein Response ; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

Abstract

Cancer is one of the major causes of mortality in organ transplant patients receiving immunosuppressive regimen based on Cyclosporin A (CsA). Organ transplantation and chronic immunosuppression is typically associated with skin cancers (both squamous cell carcinoma and melanoma) and renal cell carcinoma. Recent studies have shown that in addition to its immunosuppressive effects, accounted for by the inhibition of calcineurin and the modulation of the transcriptional program of lymphocytes, CsA also directly stimulates the growth and aggressive behavior of various cancer cells. Using renal carcinogenesis as an example, we discuss the current evidence for a role of cellular proteostasis, *i.e.* the regulation of the production, maturation and turnover of proteins in eukaryotic cells, in tumourigenesis arising under conditions of chronic immunosuppression. We present the recent studies showing that CsA induces the Unfolded Protein Response (UPR) in normal and transformed kidney cells. We examine how the UPR might be important, considering in particular the genomic analyses showing the existence of a correlation between the levels of expression of the actors of the UPR, of the chaperones of the endoplasmic reticulum and the aggressiveness of renal carcinoma. The UPR may offer a possible explanation for how immunosuppressive regimens based on CsA promote renal carcinogenesis. We discuss the opportunities offered by this biological knowledge in terms of screening, diagnosis and treatment of post-transplant cancers, and propose possible future translational studies examining the role of tumour proteostasis and the UPR in this context. (239 words)

Key words: Unfolded Protein Response, Post-transplant Cancer, Renal Cell carcinoma, Cyclosporin A

1. Introduction

Organ transplantation is the treatment of choice for patients with end stage organ insufficiency. Prevention of allograft rejection necessitates the use of immunosuppressive drugs. However, the long-term use of immunosuppressants leads to various complications. Cancer is one of the most frequent complications of immunosuppressive treatment [1,2]. The cumulative incidence of cancer increases with time after transplantation, and is estimated to reach 10% after 10 years of chronic immunosuppression [1]. Following renal transplantation, the overall risk of cancer is 3 to 5-fold greater than that of the general population [1]. Several risk factors depend on patient characteristics, such as the age, gender, existence of previous cancer, ethnicity or smoking history of the recipient [1]. Besides these risk factors, the type of immunosuppressive protocol used is most likely an important determinant of the risk of post-transplant cancer [1,2]. Calcineurin inhibitors (CNI), and especially Cyclosporin A (CsA), have been the cornerstone of immunosuppressive therapy over the past decades [2]. In practice, it is still uncertain whether CsA is the main driver of neoplasia in the common immunosuppressive regimen. However, several biological and clinical studies suggest that CsA itself may promote cancer progression [3–9]. This knowledge offers a rationale for the frequent medical practice of switching CNI to mammalian target of Rapamycin (mTOR) inhibitors in patients with post-transplant cancers [10].

Interestingly, tumours that emerge in the context of chronic immunosuppression have distinctive clinical and biological features [2]. For example, they differ in their tissular origin from the tumours found in the general population. Organ transplantation and chronic immunosuppression is typically associated with skin cancers (both squamous cell carcinoma and melanoma) and renal cell carcinoma (RCC), two tumour types that normally occur infrequently in the general population [11]. Conversely, the incidence of tumours that occur the most frequently in the general population, such as breast and prostate cancer, does not significantly increase in patients under immunosuppression [2,11]. The fact that immunosuppression hinders the functionality of the immune system and favors some infectious agents with oncogenic potential, such as the Epstein-Barr Virus (EBV) or viruses of the human papillomavirus (HPV) family, is an important element that may explain the increased incidence of some viral-induced tumours [2]. The increased risk of neoplastic complications may be partly related to a reduced ability of the immune system to control tumour cells themselves [2]. Interestingly, recent biological studies also point to the existence of pro-carcinogenic effects of CsA

that might not be directly related to immunosuppression [3–5]. This possibility is interesting, because it opens up the prospect of tailoring new immunosuppressive protocols that would not be associated with the emergence of solid tumours [2]. Here, we examine the problem of tumours arising in the context of chronic immunosuppression with CsA. We discuss how CsA broadly alters cellular proteostasis, *i.e.* the regulation of the production, maturation and turn-over of proteins in normal and cancer cells. We argue that the impact of CsA on proteostasis in the secretory compartment of eukaryotic cells could explain the occurrence of aggressive tumours after organ transplantation.

2. Cyclosporin A interferes with cellular protein folding

Over the past decades, CsA has been the most commonly used immunosuppressive drug, and the main representative of the CNI family [12]. Calcineurin is a cytoplasmic protein phosphatase involved in the regulation of the transcription factor Nuclear Factor of Activated T-cells (NF-AT) (Fig. 1). The protein Cyclophilin A (gene symbol *PPIA*) is a direct target of CsA and accounts for the inhibitory effect of CsA on calcineurin [13]. Cyclophilin A is a member of the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) family of enzymes, a family of enzymes that contribute to protein folding in eukaryotic cells by catalyzing the cis-trans isomerization of proline peptide bonds [13]. In humans, the family of cyclophilins includes seventeen protein members with different subcellular localizations [14]. Cyclophilin A is present in the cytosol of eukaryotic cells at high, micromolar concentrations. Other cyclophilins possess distinct subcellular distributions [14]. Cyclophilin D (*PP1D*) is a member of the cyclophilin family found in mitochondria. At this cellular level, Cyclophilin D is able to inhibit the Mitochondrial Permeability Transition Pore (MPTP), a large membrane pore that is typically observed *in vitro* upon exposure of purified mitochondria to high concentrations of Ca^{2+} ions, and which is formed by the apposition of mitochondrial external and internal membranes [15]. It is currently unclear to which extent the effects of Cyclophilin D depend on its PPIase activity inside mitochondria [16]. Although speculative at this stage, chronic exposure of cells to CsA might interfere with protein quality control inside mitochondria through the inhibition of Cyclophilin D. By interfering with Cyclophilin D, CsA may modulate mitochondrial physiology, contribute to the installation of a defective mitochondriome, and secondarily it may lead to altered redox metabolism of eukaryotic cells and promote oxidative stress as shown in Fig. 1 [9,17].

More recent studies have shed light on the impact of CsA on protein folding in the secretory pathway, and in particular the endoplasmic reticulum (ER) of eukaryotic cells. Two cyclophilins, Cyclophilin B (*PPIB*) and Cyclophilin C (*PP1C*), are found in the ER and can eventually be secreted [14,18,19]. Protein folding in the ER is an elaborate process that depends on molecular chaperones that are able to recognize misfolded intermediates [20]. When such intermediates are present in the lumen of the ER, they can encounter various quality control processes. For example, the retrotranslocation of the misfolded proteins and their cytosolic degradation constitute the ERAD (ER-associated degradation) process [20]. CsA interferes with the folding and maturation of secreted proteins [21]. Besides its direct inhibitory effect on the PPIase activity of cyclophilin B, CsA is able to mobilize this chaperone from the ER, leading to its secretion into the cell culture medium [22,23]. Through its interaction with Cyclophilin B, CsA also interferes with the ERAD and protein quality control in the ER of eukaryotic cells [18]. In human pathology, CsA-induced interference in protein folding in the ER has been mostly explored in the context of drug-induced nephrotoxicity, *i.e.* on primary epithelial cells [24–26]. More recent studies have explored the impact of CsA on secreted protein homeostasis of various types of human malignant cells [27–29]. In these studies, CsA induces the Unfolded Protein Response (UPR) [24,27,29]. The UPR is a set of homeostatic responses induced by cellular stresses that are able to compromise protein folding in the secretory compartment [20]. Three essential branches of the UPR have been identified in eukaryotic cells, each one defined by its main molecular protein regulator, *i.e.* the proteins PERK (PKR-like ER Kinase), IRE-1 α (Inositol-Requiring Enzyme-1 α), and ATF6 (Activating Transcription Factor-6) (Fig. 1). The IRE-1 α and ATF6 arms of the UPR regulate protein homeostasis by controlling the transcription of specific genes, such as those encoding the ER chaperones (Fig. 1) [20]. The PERK arm of the UPR reduces the general levels of protein synthesis via its ability to phosphorylate the eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α), an essential regulator of protein translation initiation [20] (Fig. 1). Activation of the UPR is usually perceived as a homeostatic response that helps normal tissues to adapt their metabolism, for example by exerting a positive feedback on the production of ER chaperones [20]. Indeed, normal and malignant kidney cells exposed to CsA overexpress chaperones such as Grp78/Bip, Grp94, Orp150 [25,29]. A strong induction of the UPR can also lead to programmed cell death by apoptosis, or changes in the production of cytokines or components of the cell microenvironment [30]. Little is known about the consequences of long term exposure of tissues to conditions that induce sustained activation of the UPR, such as those induced by chronic exposure to CsA.

3. The UPR and post-transplant cancer

The functionality of the secretion machinery has long been known to be required to sustain tumour growth and survival. For example, cancer cells often rely on peptide growth factors implicated in autocrine / paracrine stimulatory loops [31,32]. Identification of the UPR components helped demonstrate that the functionality of the ER was not only essential for tumour growth, but also that it was under stringent regulation. Today, the ER is believed to be important for almost every hallmark of malignant transformation [32]. Multiple conditions, ranging from hypoxia to nutrient deprivation, explain why tumour cells almost systematically encounter ER stress [32]. In this context, an increasing number of studies highlight the impact of the UPR in human carcinogenesis [32]. The regulation of tumour-associated angiogenesis offers one of the best examples of such regulation : in various types of solid tumours, an activated IRE-1 α arm of the UPR was found to positively regulate the production of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [33–35]. The regulation of VEGF, a key instigator of tumour angiogenesis, by the UPR illustrates the emerging concept of an angio-proteostatic network that supports tumour progression and angiogenesis [30].

Studies performed over the past decades have highlighted the contribution of ER stress to allograft injury [36]. To date however, no studies have addressed the role of the UPR in post-transplant carcinogenesis. We would like to propose the possibility that the interference of CsA with the UPR and the regulation of the secretory pathway of eukaryotic cells might promote the appearance of aggressive tumours in this context. The study of Renal Cell Carcinoma (RCC), one of the most frequent types of post-transplant cancer, is particularly illustrative in this context. CsA can promote renal cell carcinogenesis and tumour progression in a cell-autonomous and secretome-dependent manner [3]. In a recent study, CsA was also found to activate the IRE-1 α arm of the UPR, leading to potent overexpression of the ER chaperone Grp78/BIP, and at the same time to a boost in the hypoxic induction of the production of the VEGF [29]. In search of clinical evidence linking RCC tumour aggressiveness to the functionality of their secretory compartment, we have examined the expression of components of the UPR and ER chaperones that have been previously reported to be overexpressed in normal epithelial kidney cells upon exposure to CsA [25]. An *in silico* analysis centered on the expression of the corresponding genes was performed using a cohort of RCC patients from the TCGA consortium (<http://www.cbioportal.org/>; [37,38]). This analysis revealed that a subset of RCC overexpress the regulators of the UPR (XBP1 and ATF6) as well as the chaperones Grp78/BIP, PPIB (cyclophilin B), ORP150, CALR, and ERp57 at the mRNA level (Fig. 2). This subgroup

of RCC patients have poor prognosis in terms of overall survival. Interestingly, the expression levels of the cytosolic chaperone cyclophilin A/PPIA does not have a similar impact on the survival of RCC patients (data not shown). This analysis suggests that the secretory proteostasis of tumour cells is a strong determinant of RCC tumour aggressiveness (Fig. 2). We propose that chronic exposure of cells to CsA might activate the UPR and promote the emergence of cancer cells with an ER chaperone-overexpressing phenotype, therefore possibly facilitating the emergence of aggressive RCC.

4. Biomarkers of cellular secretory proteostasis for the diagnosis and stratification of post-transplant cancer?

In the absence of established animal models or well-characterized cancer cell lines that would permit the experimental study of CsA-associated carcinogenesis, it is still unknown how post-transplant cancers emerge. In Table 1, we propose a list of candidate markers of the UPR that could be applicable in the clinical context and that could help to address the role of the UPR in this setting. Sequencing the genome of tumours that have developed in patients receiving CsA after organ transplantation constitutes an obvious and promising approach to understand carcinogenesis in this context. By comparing the spectrum of genomic mutations in tumours that have developed post-CsA exposure to other tumours, it might be possible to observe a distinctive mutation signature and specific genomic events [39]. Interestingly, some of the genes that encode the regulators of the different branches of the UPR, such as *ERN1* and *ATF6*, that encode IRE-1 α and ATF6, respectively, are mutated in a small number of solid tumours [40]. Some of these mutations could possibly change the regulation of the UPR and may perhaps be observed at an increased frequency in post-transplant cancer. Besides the analysis of genomic alterations found in these tumours, the interpretation of gene expression profiles, such as those presented in Fig. 2, could be useful to probe the activation status of the UPR in tumour samples [35,41]. Detecting the UPR signature in post-transplant cancer could help to better understand the sequence of events initiated by CsA in this context. In addition to genomic exploration, we also propose to address the role of the UPR with protein markers in the serum of patients with post-transplant cancer [42]. Circulating chaperones produced and secreted by cancer cells, such as calreticulin, are eventually released by cancer cells and they can be detected in the blood of cancer patients [43]. In addition to these well-established chaperones and markers of ER stress, new and powerful proteomic approaches, relying for example on stable isotope labeling, hold some promise for the identification of new biomarkers of the UPR and altered secretory proteostasis

[23,44]. Comparing the serum levels of such markers in patients that have undergone organ transplantation, with or without post-transplant cancer might be useful to address the possible role of altered cellular secretory proteostasis in this context. Comparing patients with post-transplant cancer with those bearing tumours that have arisen in the absence of immunosuppression might also be interesting. Interestingly, the serum levels of angiogenic growth factors, such as the VEGF, whose production is under strong regulation by the UPR, may also be of interest as a biological parameter reflecting the burden of CsA on the ER proteostasis [30].

In addition to increased understanding of the emergence of post-transplant cancers, studying tumour secretory proteostasis may be useful in the diagnosis and treatment of these tumours. Detecting tumours at an early stage is usually presented as one of the best strategies to reduce cancer mortality and increase the possibility of using curative protocols [45]. While organ transplant patients are considered to be at a higher risk of cancer than the general population, no established biological markers are currently available for tumour screening in this setting. The possibility that the UPR and the components of the protein folding machinery of the ER might contribute to post-transplant carcinogenesis holds the potential of identifying new biomarkers, such as those listed in Table 1. These biomarkers could help to define a sub-population of organ transplant patients that are at an increased risk of developing aggressive post-transplant cancer and might be candidates for specific cancer screening protocols. Finally, such biomarkers may also be worth considering in order to individually tailor the therapeutic approach [20,46]. This possibility might be especially important for tumours, such as RCC, in which the UPR and cellular secretory proteostasis might be important determinants of the response to anti-angiogenic treatments [30,47]. Finally, in the future, the UPR might also offer new possibilities of direct therapeutic targeting against post-transplant cancer [20], and especially against RCC occurring in patients exposed to CsA [29,47]. The study of the UPR therefore offers rich perspectives for a better diagnosis and treatment of post-transplant cancer.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the help of Dr Zuzana Saidak with TCGA analysis and edition of the manuscript. We apologize to the many colleagues whose work could not be cited here due to space limitations.

Declaration of interest and Funding information

The authors have no conflicts of interest to declare. This work was supported by CHU Amiens and Ligue contre le Cancer, Comité de la Somme.

References

- 1 Chapman, J. R., Webster, A. C. and Wong, G. (2013) Cancer in the transplant recipient. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**.
- 2 Geissler, E. K. (2015) Post-transplantation malignancies: here today, gone tomorrow? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **12**, 705–717.
- 3 Hojo, M., Morimoto, T., Maluccio, M., Asano, T., Morimoto, K., Lagman, M., Shimbo, T. and Suthanthiran, M. (1999) Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* **397**, 530–534.
- 4 Basu, A., Contreras, A. G., Datta, D., Flynn, E., Zeng, L., Cohen, H. T., Briscoe, D. M. and Pal, S. (2008) Overexpression of vascular endothelial growth factor and the development of post-transplantation cancer. *Cancer Res.* **68**, 5689–5698.
- 5 Datta, D., Contreras, A. G., Basu, A., Dormond, O., Flynn, E., Briscoe, D. M. and Pal, S. (2009) Calcineurin inhibitors activate the proto-oncogene Ras and promote protumorigenic signals in renal cancer cells. *Cancer Res.* **69**, 8902–8909.
- 6 Walsh, S. B., Xu, J., Xu, H., Kurundkar, A. R., Maheshwari, A., Grizzle, W. E., Timares, L., Huang, C. C., Kopelovich, L., Elmets, C. A., et al. (2011) Cyclosporine a mediates pathogenesis of aggressive cutaneous squamous cell carcinoma by augmenting epithelial-mesenchymal transition: role of TGF β signaling pathway. *Mol. Carcinog.* **50**, 516–527.
- 7 Basu, A., Liu, T., Banerjee, P., Flynn, E., Zurakowski, D., Datta, D., Viklicky, O., Gasser, M., Waaga-Gasser, A. M., Yang, J., et al. (2012) Effectiveness of a combination therapy using calcineurin inhibitor and mTOR inhibitor in preventing allograft rejection and post-transplantation renal cancer progression. *Cancer Lett.* **321**, 179–186.
- 8 Euvrard, S., Morelon, E., Rostaing, L., Goffin, E., Brocard, A., Tromme, I., Broeders, N., del Marmol, V., Chatelet, V., Dompormartin, A., et al. (2012) Sirolimus and secondary skin-cancer prevention in kidney transplantation. *N. Engl. J. Med.* **367**, 329–339.
- 9 Zhou, A. Y. and Ryeom, S. (2014) Cyclosporin A promotes tumor angiogenesis in a calcineurin-independent manner by increasing mitochondrial reactive oxygen species. *Mol. Cancer Res. MCR* **12**, 1663–1676.
- 10 Cheung, C. Y., Ma, M. K. M., Chak, W. L., Chau, K. F. and Tang, S. C. W. (2017) Conversion to mammalian target of rapamycin inhibitors in kidney transplant recipients with de novo cancers. *Oncotarget*.
- 11 Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Fraumeni, J. F., Kasiske, B. L., Israni, A. K., Snyder, J. J., Wolfe, R. A., Goodrich, N. P., Bayakly, A. R., Clarke, C. A., et al. (2011) Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA* **306**, 1891–1901.
- 12 Halloran, P. F. (2004) Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2715–2729.
- 13 Nigro, P., Pompilio, G. and Capogrossi, M. C. (2013) Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis.* **4**, e888.
- 14 Bukrinsky, M. (2015) Extracellular cyclophilins in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1850**, 2087–2095.
- 15 Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T. and Tsujimoto, Y. (2005) Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* **434**, 652–658.
- 16 Lin, D.-T. and Lechleiter, J. D. (2002) Mitochondrial targeted cyclophilin D protects cells from cell death by peptidyl prolyl isomerization. *J. Biol. Chem.* **277**, 31134–31141.
- 17 Youle, R. J. and Narendra, D. P. (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 9–14.

- 18 Bernasconi, R., Soldà, T., Galli, C., Pertel, T., Luban, J. and Molinari, M. (2010) Cyclosporine A-sensitive, cyclophilin B-dependent endoplasmic reticulum-associated degradation. *PloS One* **5**.
- 19 Stocki, P., Chapman, D. C., Beach, L. A. and Williams, D. B. (2014) Depletion of cyclophilins B and C leads to dysregulation of endoplasmic reticulum redox homeostasis. *J. Biol. Chem.* **289**, 23086–23096.
- 20 Wang, M. and Kaufman, R. J. (2016) Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* **529**, 326–335.
- 21 Lodish, H. F. and Kong, N. (1991) Cyclosporin A inhibits an initial step in folding of transferrin within the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **266**, 14835–14838.
- 22 Price, E. R., Jin, M., Lim, D., Pati, S., Walsh, C. T. and McKeon, F. D. (1994) Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 3931–3935.
- 23 Lamoureux, F., Gastinel, L. N., Mestre, E., Marquet, P. and Essig, M. (2012) Mapping cyclosporine-induced changes in protein secretion by renal cells using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). *J. Proteomics* **75**, 3674–3687.
- 24 Pallet, N., Bouvier, N., Bendjallab, A., Rabant, M., Flinois, J. P., Hertig, A., Legendre, C., Beaune, P., Thervet, E. and Anglicheau, D. (2008) Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **8**, 2283–2296.
- 25 Lamoureux, F., Mestre, E., Essig, M., Sauvage, F. L., Marquet, P. and Gastinel, L. N. (2011) Quantitative proteomic analysis of cyclosporine-induced toxicity in a human kidney cell line and comparison with tacrolimus. *J. Proteomics* **75**, 677–694.
- 26 Bouvier, N., Fougeray, S., Beaune, P., Thervet, E. and Pallet, N. (2012) The unfolded protein response regulates an angiogenic response by the kidney epithelium during ischemic stress. *J. Biol. Chem.* **287**, 14557–14568.
- 27 Ciechomska, I. A., Gabrusiewicz, K., Szczepankiewicz, A. A. and Kaminska, B. (2013) Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy in malignant glioma cells undergoing cyclosporine a-induced cell death. *Oncogene* **32**, 1518–1529.
- 28 Ram, B. M. and Ramakrishna, G. (2014) Endoplasmic reticulum vacuolation and unfolded protein response leading to paraptosis like cell death in cyclosporine A treated cancer cervix cells is mediated by cyclophilin B inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 2497–2512.
- 29 Bodeau, S., Sauzay, C., Nyga, R., Louandre, C., Descamps, V., François, C., Godin, C., Choukroun, G. and Galmiche, A. (2017) Targeting the Unfolded Protein Response as a potential therapeutic strategy in renal carcinoma cells exposed to Cyclosporine A. *Anticancer Res.* **in press**.
- 30 Devisscher, L., Vieri, M., Logue, S. E., Panse, J., Geerts, A., van Vlierberghe, H., Chevet, E., Gorman, A. M., Samali, A. and Kharabi Masouleh, B. (2016) Targeting the angio-proteostasis network: Combining the forces against cancer. *Pharmacol. Ther.* **167**, 1–12.
- 31 Dejeans, N., Barroso, K., Fernandez-Zapico, M. E., Samali, A. and Chevet, E. (2015) Novel roles of the unfolded protein response in the control of tumor development and aggressiveness. *Semin. Cancer Biol.* **33**, 67–73.
- 32 Urrea, H., Dufey, E., Avril, T., Chevet, E. and Hetz, C. (2016) Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends Cancer* **2**, 252–262.
- 33 Drogat, B., Auguste, P., Nguyen, D. T., Bouchecareilh, M., Pineau, R., Nalbantoglu, J., Kaufman, R. J., Chevet, E., Bikfalvi, A. and Moenner, M. (2007) IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. *Cancer Res.* **67**, 6700–6707.
- 34 Ghosh, R., Lipson, K. L., Sargent, K. E., Mercurio, A. M., Hunt, J. S., Ron, D. and Urano, F. (2010) Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PloS One* **5**, e9575.

- 35 Chen, X., Iliopoulos, D., Zhang, Q., Tang, Q., Greenblatt, M. B., Hatzia Apostolou, M., Lim, E., Tam, W. L., Ni, M., Chen, Y., et al. (2014) XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature* **508**, 103–107.
- 36 Pallet, N., Fougerey, S., Beaune, P., Legendre, C., Thervet, E. and Anglicheau, D. (2009) Endoplasmic reticulum stress: an unrecognized actor in solid organ transplantation. *Transplantation* **88**, 605–613.
- 37 Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., et al. (2012) The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2**, 401–404.
- 38 Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., et al. (2013) Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* **6**, p1.
- 39 Turajlic, S., Larkin, J. and Swanton, C. (2015) SnapShot: Renal Cell Carcinoma. *Cell* **163**, 1556–1556.e1.
- 40 Chevet, E., Hetz, C. and Samali, A. (2015) Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer Discov.* **5**, 586–597.
- 41 Andruska, N., Zheng, X., Yang, X., Helferich, W. G. and Shapiro, D. J. (2015) Anticipatory estrogen activation of the unfolded protein response is linked to cell proliferation and poor survival in estrogen receptor α -positive breast cancer. *Oncogene* **34**, 3760–3769.
- 42 Galmiche, A., Sauzay, C., Houessinon, A., Chauffert, B. and Pluquet, O. (2016) Probing Tumour Proteostasis and the UPR with Serum Markers. *Trends Cancer* **2**, 219–21.
- 43 Chignard, N., Shang, S., Wang, H., Marrero, J., Bréchet, C., Hanash, S. and Beretta, L. (2006) Cleavage of endoplasmic reticulum proteins in hepatocellular carcinoma: Detection of generated fragments in patient sera. *Gastroenterology* **130**, 2010–2022.
- 44 Borrebaeck, C. A. K. (2017) Precision diagnostics: moving towards protein biomarker signatures of clinical utility in cancer. *Nat. Rev. Cancer.*
- 45 Escudier, B., Porta, C., Schmidinger, M., Rioux-Leclercq, N., Bex, A., Khoo, V., Gruenvald, V., Horwich, A. and ESMO Guidelines Committee. (2016) Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **27**, v58–v68.
- 46 Galmiche, A., Sauzay, C., Chevet, E. and Pluquet, O. (2017) Role of the unfolded protein response in tumor cell characteristics and cancer outcome. *Curr. Opin. Oncol.* **29**, 41–47.
- 47 Han, K. S., Li, N., Raven, P. A., Fazli, L., Frees, S., Ettinger, S., Park, K. C., Hong, S. J., Gleave, M. E. and So, A. I. (2015) Inhibition of endoplasmic reticulum chaperone protein glucose-regulated protein 78 potentiates anti-angiogenic therapy in renal cell carcinoma through inactivation of the PERK/eIF2 α pathway. *Oncotarget* **6**, 34818–34830.
- 48 Fang, F., Flegler, A. J., Du, P., Lin, S. and Clevenger, C. V. (2009) Expression of cyclophilin B is associated with malignant progression and regulation of genes implicated in the pathogenesis of breast cancer. *Am. J. Pathol.* **174**, 297–308.
- 49 Phuoc, N. B., Ehara, H., Gotoh, T., Nakano, M., Kamei, S., Deguchi, T. and Hirose, Y. (2008) Prognostic value of the co-expression of carbonic anhydrase IX and vascular endothelial growth factor in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **20**, 525–530.
- 50 Miyake, M., Goodison, S., Lawton, A., Gomes-Giacoa, E. and Rosser, C. J. (2015) Angiogenin promotes tumoral growth and angiogenesis by regulating matrix metalloproteinase-2 expression via the ERK1/2 pathway. *Oncogene* **34**, 890–901.

Figure Legends

Fig. 1. Cyclophilins regulate protein folding in different cellular compartments.

Cyclosporin A (CsA) binds to and interferes with the catalytic activity of Cyclophilins (CyP), a family of enzymes with peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) activity. CyPA is widely acknowledged as the biological target of CsA that accounts for most of its immunosuppressive effects, through its control of the transcriptional program of immune cells. Much less is known about the role of the other members of this enzyme family. CyPD is localized inside mitochondria, where it is reported to regulate the mitochondrial permeability transition pore (MPTP), a large protein channel formed by the apposition of mitochondrial external and internal membranes. At the mitochondrial level, CyPD may alter mitochondrial metabolism, leading to the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and changing the turn-over of this organelle. The two main members of the cyclophilin family present in the ER are CyPB and CyPC. In eukaryotic cells exposed to CsA, the inhibition of both cyclophilins induces the Unfolded Protein Response (UPR). The UPR is a homeostatic response with a broad impact on cell physiology and transcriptional regulation. The proteins PERK (PKR-like ER Kinase), IRE-1 α (Inositol-Requiring Enzyme-1 α), and ATF6 (Activating Transcription Factor-6) are the main regulators of the UPR. Their activation occurs in the context of ER stress and is a key element in the regulation of the cellular secretory proteostasis. The PERK kinase reduces general levels of protein synthesis via the phosphorylation of its substrate, the eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α). The IRE-1 α and ATF6 arms of the UPR are typically involved in the transcriptional activation of a broad array of genes involved in the regulation of protein folding, including ER chaperone proteins, such as *HSPA5*, *PDIA3*, *CANX*, *CALR*. They are also reported to regulate the production of the angiogenic factor Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).

Fig. 2. Overexpression of ER chaperones defines a subset of RCC with an aggressive phenotype.

We present a Kaplan–Meier analysis of the overall survival of RCC patients (n=293) for eight essential genes encoding components of the UPR or ER chaperones. For each gene indicated (*ATF6*, *XBP1*,

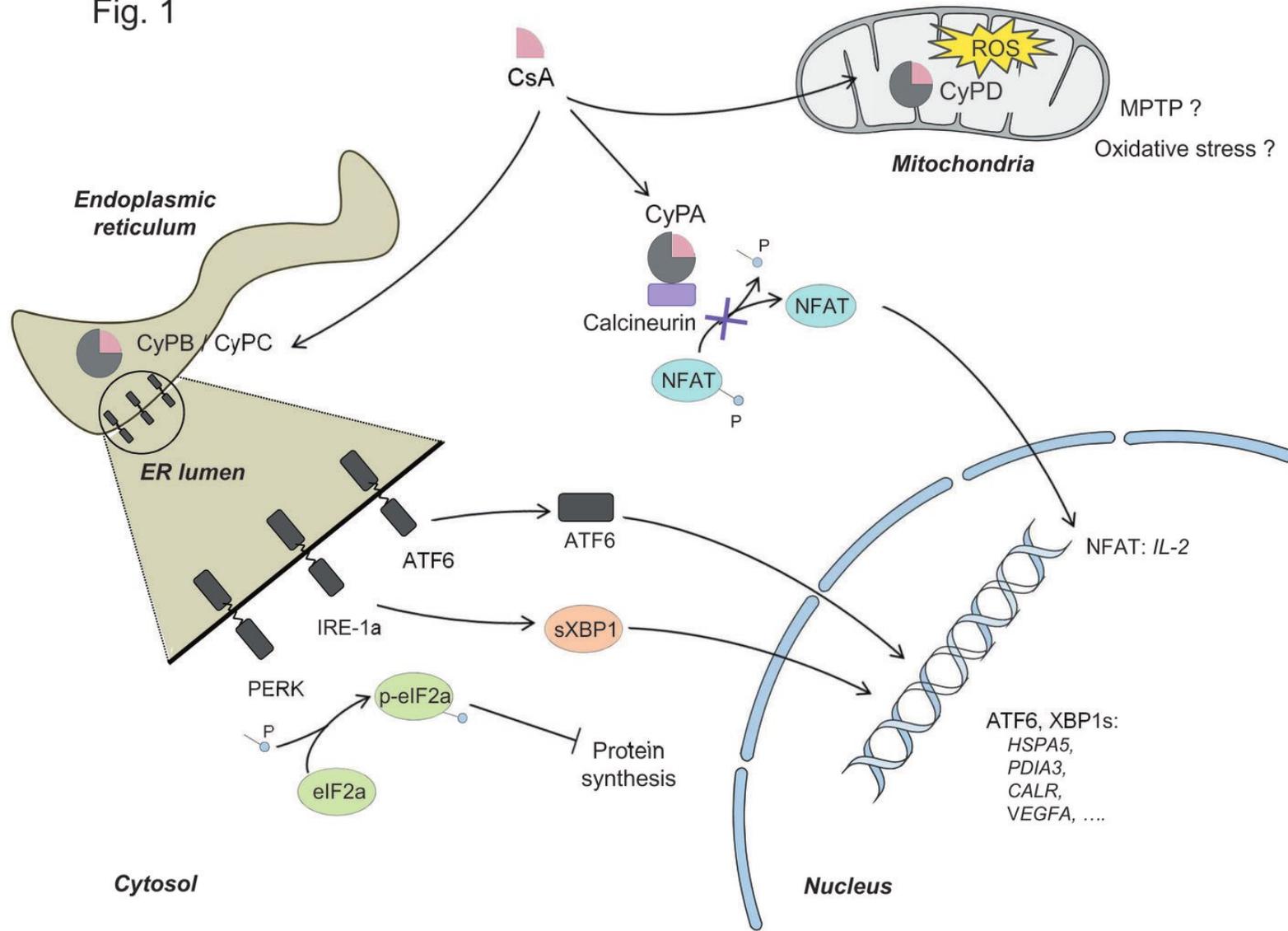
DDIT3, *PPIB*, *HSPA5*, *HYOU1*, *CALR* or *PDIA3*, encoding ATF6, XBP1, CHOP, CyPB, Bip/GRP78, Orp150 Calreticulin and ERp57 respectively), survival data were extracted from the RCC cohort of the TCGA consortium. A Z score value > 1 was used to identify the subset of RCC tumours overexpressing the corresponding genes (red), compared to the tumours that do not overexpress the indicated gene (blue). Note that for each of the genes examined here, OS was significantly different between the two subsets ($p < 0.05$).

Table 1: A selection of biological markers potentially applicable for the exploration of the UPR in post-transplant cancer

Marker (gene)	Biological function	Matrix used	Analysis	References
IRE-1 α (<i>ERN1</i>)	UPR	Tumour	IHC ¹ , genomics	[35,41]
ATF6 (<i>ATF6</i>)	UPR	Tumour	IHC, genomics	[41]
PERK (<i>EIF2AK3</i>)	UPR	Tumour	IHC, genomics	[41]
Grp78/BIP (<i>HSPA5</i>)	ER chaperone	Tumour / serum	IHC / protein quantification ²	[41,43]
Cyclophilin B (<i>PPIB</i>)	ER chaperone	Tumour / serum	IHC / protein quantification	[23,48]
ERp57 (<i>PDIA3</i>)	ER chaperone	Tumour / serum	IHC / protein quantification	[25,43]
Calreticulin (<i>CALR</i>)	ER chaperone	Tumour / serum	IHC / protein quantification	[43]
VEGF (<i>VEGFA</i>)	Angiogenic factor	Tumour / serum	IHC / protein quantification	[26,33,34,49]
Angiogenin (<i>ANG</i>)	Angiogenic factor	Tumour / serum	IHC / protein quantification	[26,50]

Footnote : ¹ IHC: Immunohistochemistry. ² quantification applies to the entire protein or its peptide fragments

Fig. 1



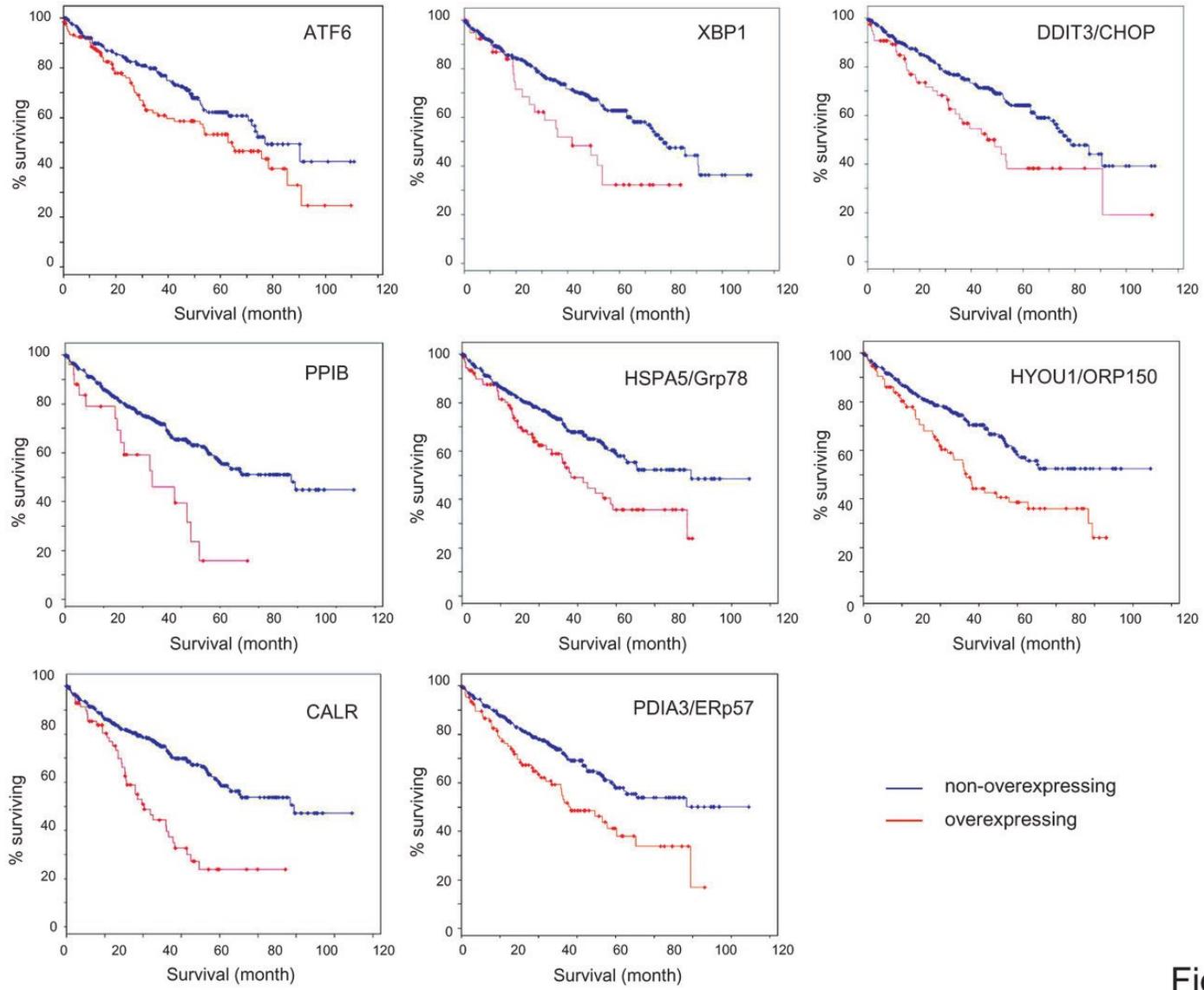


Fig. 2

III. Article 3 : Etude de l'association entre les polymorphismes du VEGF et des VEGFR et le risque de RCC post-transplantation : étude cas/témoin dans une cohorte de patients transplantés rénaux

Dans cet article, nous avons recherché une association entre des polymorphismes du VEGF ou des VEGFR et la progression ou l'agressivité du RCC afin d'examiner un aspect de l'hétérogénéité de réponse aux stimuli pro-angiogéniques chez les patients transplantés.

Cet article sera soumis prochainement dans la revue *Pharmacogenomics* :

A protective role of the VEGF 936 C>T polymorphism on renal cell carcinoma risk in renal transplanted patients

M-C. Quinton, C. Sauzay, Y. Bennis, I. Etienne, J. Romezin, J. Meynier, C. Picard, M. Hazzan, A. Galmiche, G. Choukroun and S. Bodeau

A protective role of the VEGF 936 C>T polymorphism on the risk of renal cell carcinoma in renal transplanted patients

M-C. Quinton¹, C. Sauzay^{2,3}, Y. Bennis^{1,4}, I. Etienne⁵, J. Romezin⁶, J. Meynier⁷, C. Picard⁷, M. Hazzan⁸, A. Galmiche^{2,3}, G. Choukroun^{4,9}, S. Bodeau^{1,4}

¹ Department of Pharmacology and Toxicology, Amiens University Hospital, Amiens, France

² Department of Biochemistry, Amiens University Hospital, Amiens, France

³ EA4666, University of Picardie Jules Verne, Amiens, France

⁴ INSERM_U1088, University of Picardie Jules Verne, Amiens, France

⁵ Department of Nephrology, Rouen University Hospital, Rouen, France

⁶ Department of clinical research, Amiens University Hospital, Amiens, France

⁷ Department of Research and Innovation, Amiens University Hospital Amiens, France

⁸ Department of Nephrology, Lille University Hospital, Lille, France

⁹ Department of Nephrology, Amiens University Hospital, Amiens, France

Corresponding author:

Dr Sandra Bodeau
Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie, Centre de Biologie Humaine (CBH)
CHU Amiens-Picardie, site sud
Route de Conty
80054 Amiens cedex 1, France

Tel : 033-(0)322087034 ; Fax : 033-(0)322087029

E-mail : bodeau.sandra@chu-amiens.fr

Abstract

Context: Post-transplant cancers are one of the most frequent complications arising under chronic immunosuppression exposure. In this context, vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a central role in the development and the progression of renal cell carcinoma (RCC), the second mostly observed post-transplant cancer. *VEGF* and *VEGFR* (*KDR*, *FLT4*) are highly polymorphic genes and their polymorphisms have been studied with success in certain cancers, such as RCC. However, to date, no study has explored genetic association between *VEGF* or *VEGFR* polymorphisms and susceptibility or prognosis of RCC in renal transplanted patients.

Materials and methods: We genotyped eight polymorphisms in *VEGF* (-2578 A>C (rs699947), -2489 C>T (rs1005230), -460 C>T (rs833061), -1154 G>A (rs1570360), -634 G>C (rs2010963), -7 C>T (rs25648), 936 C>T (rs3025039), 1612 G>A (rs10434)), 2 polymorphisms in *KDR* (1416 T>A (rs1870377), 889 G>A (rs2305948)) and 2 polymorphisms in *FLT4* (1480 A>G (rs307826), 3971 G>T (rs307821)). We assessed their association with risk of RCC and prognosis in a case-control study involving 30 cases and 30 controls from a renal transplanted population.

Results: Interestingly, we found that *VEGF* 936 T in the 3' UTR was significantly associated with a decreased risk of RCC (OR=0.14; CI 95%: 0.023-0.83; p=0.03). Furthermore, patients with the *VEGF* 936 CT genotype tended to have an improved survival (Log-rank p=0.12) and a decreased tumour size (p=0.16) than those with the CC genotype.

Discussion: Our findings suggest that the *VEGF* 936 C>T may be a genetic predictor of RCC risk in renal transplanted patients and may be helpful to personalize immunosuppressive treatments in this population. However, further validations in a largest population and additional functional studies are required to better understand the role of *VEGF* 936 C>T before to envisage its use in clinical practice.

Key words: *VEGF* polymorphisms, renal cell carcinoma, renal transplanted patients

Introduction

In recent decades, major advances in immunosuppressive treatments have significantly reduced acute rejection episodes and have improved survival of patients (G. Knoll 2008). However, the long-term use of immunosuppressive drugs is offset by the emergence of neoplastic complications which have become one of the three leading causes of death in transplanted patients (Chapman, Webster, and Wong 2013; Geissler 2015). Tumours arising in the context of transplantation and chronic immunosuppression have particular clinical and biological features (Geissler 2015). Thus renal cell carcinoma (RCC), a cancer rarely observed in general population, is dramatically increased after transplantation. Its incidence is increased by a factor 15 in renal transplanted patients (Kasiske et al. 2004) and it represents the second mostly observed cancer after nonmelanoma skin cancers (Engels et al. 2011). The increased cancer risk has been associated with the use of immunosuppressive drugs and especially with the use of calcineurin inhibitors (CNI – cyclosporine A and tacrolimus) (Geissler 2015). Thus, several biological and clinical studies suggest that CNI themselves may promote cancer progression (Hojo et al. 1999; Basu et al. 2008; Datta et al. 2009; Basu et al. 2010; Walsh et al. 2011; Euvrard et al. 2012; Zhou and Ryeom 2014). Interestingly, several of these studies have shown that CNI may induce the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) leading to create an angiogenic environment and to favour tumour growth (Basu et al. 2008; Datta et al. 2009; Basu et al. 2010).

VEGF is a potent angiogenic factor which plays a central role in the development and the progression of RCC (Goel and Mercurio 2013; Ellis and Hicklin 2008). *VEGF* and *VEGFR* (*KDR*, *FLT4*) are highly polymorphic genes and their polymorphisms have been studied with success in certain cancers, such as RCC (Jain et al. 2009; Beuselinck et al. 2013; Scartozzi et al. 2013; Rogers and D'Amato 2012; Gong et al. 2017). Thus, common polymorphisms in *VEGF* or *VEGFR* may affect the response to angiogenic stimuli and thereby modify susceptibility to RCC (Rogers and D'Amato 2012). However, to date, no study has explored

genetic association between *VEGF* or *VEGFR* polymorphisms and risk of RCC in renal transplanted patients which have an increased risk of RCC compared to general population. A switch from CNI to mTOR inhibitors could be envisaged in these at risk-patients. Although there is no recommendation to date, this switch is a frequent medical practice in patients who have developed post-transplant cancers (Cheung et al. 2017). Indeed, mTOR inhibitors have antiproliferative and antiangiogenic properties and, they have already been associated with a decreased post-transplant cancers incidence in clinical studies (Kauffman et al. 2005; G. A. Knoll et al. 2014; Geissler 2015; Cheung et al. 2017). However, they can't be used in first-line immunosuppressive treatment because there are associated with an increased risk of acute rejection (Lebranchu et al. 2009).

In our present study, we selected eight polymorphisms in *VEGF* (-2578 A>C (rs699947), -460 C>T (rs833061), -1154 G>A (rs1570360), -634 G>C (rs2010963), -2489 C>T (rs1005230), -7 C>T (rs25648), 936 C>T (rs3025039), 1612 G>A (rs10434)), two polymorphisms in *KDR* (1416 T>A (rs1870377), 889 G>A (rs2305948)) and two polymorphisms in *FLT4* (1480 A>G (rs307826), 3971 G>T (rs307821)). We evaluated their association with susceptibility and prognosis of RCC in a case-control study conducted in 60 renal transplanted patients. We propose that the detection of *VEGF* or *VEGFR* polymorphisms could be helpful to identify sub-groups of patients at risk to develop a RCC and to personalize their immunosuppressive treatments.

Materials and methods

-Study population

A total of 60 renal transplanted patients (30 cases and 30 controls) were retrospectively included in our study. Cases are renal transplanted patients who developed after the transplantation a biopsy proven RCC on the native kidney. Controls are renal transplant recipients without cancer, matched to cases on gender and age (\pm 5 years), and with a post-transplant period as long as that of the cases. Post-transplant period was calculated from the date of renal transplantation to the date of cancer diagnosis for the cases and, from the date of renal transplantation to the date of last follow-up or death for the controls.

This study was approved by the local ethics committees of the Amiens University Hospital and the written informed consent was obtained from each living patient at inclusion. The following inclusion criteria were used: (i) patient age \geq 18 years, (ii) patient who has received a first or a second renal transplantation between the 2002/01/01 and the 2011/12/31 at the Amiens University Hospital, (iii) cases had biopsy proven diagnosis of RCC, (iv) no cancer diagnosed in the controls (v) patient's DNA available. The exclusion criteria were (i) patient age <18 years, (ii) patients followed-up at the Amiens University Hospital but transplanted in another site, (iii) patient who had combined kidney and pancreas, heart, or liver transplantation. For each patient, the following clinical data were recorded from the medical file before the genetic study was carried out: date of birth, sex, ethnic origin, smoking status, primary cause of renal failure, antecedent of cancers, prior immunosuppressive treatment, time spent on dialysis before transplantation, induction therapy, immunosuppressive drug regimens. For each patient, we evaluated the exposure under each immunosuppressive drug by calculating the time of exposition and verifying that plasmatic concentrations reached the therapeutic range at each control's visit. For each case, age at RCC diagnosis, tumour size and histology, Fuhrman grade, cancer treatment and evolution and management of immunosuppressive drugs after the diagnosis of RCC were also noted.

-Single nucleotide polymorphisms (SNPs) selection and genotyping

Polymorphisms in *VEGF*, *KDR* and *FLT4* were selected if they met the following criteria (i) located in the promoter, the 5' untranslated region (UTR), the 3'UTR, or the coding region causing an amino acid change, (ii) a minor allele frequency greater than 8%, (iii) previously associated with functional or clinical consequences. We selected eight polymorphisms in *VEGF* (-2578 A>C (rs699947), -2489 C>T (rs1005230), -460 C>T (rs833061), -1154 G>A (rs1570360), -634 G>C (rs2010963), -7 C>T (rs25648), 936 C>T (rs3025039), 1612 G>A (rs10434)), two polymorphisms in *KDR* (1416 T>A (rs1870377), 889 G>A (rs2305948)) and two polymorphisms in *FLT4* (1480 A>G (rs307826), 3971 G>T (rs307821)).

Genomic DNA had previously been extracted from whole blood on the GenoM-6™ automate and, then stored at -80°C until analysis. Before genotyping, DNA concentration was measured using the Nanodrop 2000™ spectrophotometer (ThermoFisher scientific, Villebon sur Yvette, France) and, was normalized at 1 ng/μL DNA in nuclease-free water for each sample. Genotyping was performed according to the TaqMan allelic discrimination assay on a StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Primers and probes were purchased from Applied Biosystems. The PCR reactions were carried out according to manufacturer's recommendations in a total volume of 25 μL containing Taqman Genotyping PCR Master Mix, Taqman SNP AssayMix 40X and 12 ng of genomic DNA. The PCR conditions were 30 sec at 60°C, 10 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. The data were analysed using the StepOne software v.2.1 (Applied Biosystems).

-Statistical analysis

Differences in the distribution of demographic characteristics between cases and controls were evaluated using the Mann-Whitney test (for continuous variables) and the chi-square test or the Fisher's exact test (for categorical variables).

Allele frequencies of each polymorphism were tested for deviations from Hardy-Weinberg equilibrium using the Fisher's exact test. Concerning haplotypes, we estimated pairwise linkage disequilibrium between *VEGF* or *VEGFR* polymorphisms and, the most probable haplotypes were inferred for each patient (with expectation maximization algorithm).

Associations between polymorphisms (SNPs or haplotypes) and risk of RCC were estimated using odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI) calculated with a conditional univariate and multivariate logistic regression analysis after adjustment on confounders (age, sex and post-transplant period). Variables with a p-value less than 0.1 were considered significant in the univariate model and were tested in the multivariate analysis with a backward stepwise selection. Variables with significance level less or equal than 0.05 were retained in the final multivariate model.

Differences in tumour sizes among different genetic groups were evaluated using the ANOVA test. Differences in Fuhrman grades among different genetic groups were evaluated using the chi-square test or the Fisher's exact test.

Survival time was calculated from the date of renal transplantation to the date of death or last follow-up. Different survival times according to *VEGF*, *KDR* or *FLT4* polymorphisms were estimated using the Kaplan-Meier method and compared using the Log-rank test.

All analyses were performed using SAS or R softwares (with "SNPassoc", "Haplo.stats", "Genetics" packages). We considered variables with a p-value less or equal than 0.05 as statistically significant.

Results

-Characteristics of RCC patients and controls

Clinical and demographic characteristics of the study population are presented in table 1. There were no significant differences between cases and controls with regard to age, sex ratio, ethnic origin, smoking status, primary cause of renal failure, antecedent of cancers, prior immunosuppressive treatment and time spent on dialysis before transplantation (table 1; $p>0.05$). Immunosuppressive drugs exposure was similar in both groups in the majority of cases. However, MPA (mycophenolic acid) exposure was significantly higher in the control group (table 1). This result is in accordance with the longer post-transplant period observed in the control group (table 1; $p<0.01$). Indeed, as the cumulative incidence of cancers increases with the time post-transplantation, the controls have been selected if they had a post-transplant period at least equal to that of the cases. For CNI and sirolimus, the same trend was observed as with MPA but not significantly.

The demographic and clinical features of the patients included in the case group are presented in table 2. The mean age at RCC diagnosis was 52.4 years-old. Different histological types of RCC were diagnosed. Thirteen patients (43.3%) presented a clear cell RCC (ccRCC) and 11 patients (36.7%) presented a papillary RCC (pRCC) (table 2). The mean size of the tumour was 20.5 mm on its major axis. At the diagnosis, the majority of tumours (56.7%) were grade II of Fuhrman. It is important to note that only two patients relapsed. This is probably due to the early diagnosis of RCC and to the surgical treatment consisting in ablation of the non-functional native kidney in 100% of cases. A patient whose cancer was diagnosed at a metastatic stage also benefited of a palliative radiotherapy. Concerning the management of immunosuppressive treatments after the diagnosis of RCC, we didn't observe a marked tendency (table 2). It may be explained by the absence of recommendations as well as the evolution of practices during the study period.

-Association of *VEGF*, *KDR* and *FLT4* polymorphisms with risk of RCC

The genotype distributions of all the studied polymorphisms were in the Hardy-Weinberg equilibrium (table 3, $p \geq 0.05$).

As previously described, a strong linkage disequilibrium was observed among *VEGF* polymorphisms at positions -2578, -2489 and -460 ($D'_{-2578/-2489}=0.99$, $r^2_{-2578/-2489}=0.99$; $D'_{-2578/-460}=0.95$, $r^2_{-2578/-460}=0.92$; $D'_{-2489/-460}=0.95$, $r^2_{-2489/-460}=0.92$). Among the three haplotypes identified in our study, two occurred most frequently: CCT (54.24%) and ATC (44.1%). The other haplotype occurred in 1.7% of the samples.

Associations between *VEGF*, *KDR* and *FLT4* polymorphisms (SNPs or haplotypes), non-genetic variables and risk of RCC were tested using a conditional univariate logistic regression model after adjustment on confounders. For genetic variables, the results are summarized in table 4 A. Among the 12 polymorphisms genotyped, *VEGF* 936 C>T and *VEGF* -1154 G>A were associated with risk of RCC in the univariate analysis ($p < 0.1$). No significant association was found with the other polymorphisms (SNPs or haplotypes) in *VEGF*, *KDR* or *FLT4* (table 4 A). For the non-genetic variables studied (supplementary table 1), only the MPA exposure was less than 0.1% in the univariate model. All these variables were included in the conditional multivariate logistic regression analysis (table 4 B). In the final multivariate model, we found that the *VEGF* 936 T allele was significantly associated with a decreased risk of RCC (OR=0.14; CI 95%: 0.023-0.83; $p=0.03$).

-Effect of *VEGF*, *KDR* and *FLT4* polymorphisms on RCC aggressiveness

We evaluated the effect of the *VEGF*, *KDR* and *FLT4* polymorphisms on the RCC aggressiveness by comparing the differences in Fuhrman grades or tumour sizes among the different genetic groups. For each polymorphism studied, we didn't observe significant differences in Fuhrman grades repartition among the genotypes (data not shown; $p > 0.05$). Concerning tumour sizes, patients carrying the genotype *VEGF* -1154 AA had a significant

increased tumour size compared to carriers of the *VEGF* -1154 GA and GG genotypes (figure 1 A, $p < 0.05$). We didn't observe significant differences for the other polymorphisms (data not shown; $p > 0.05$). However, interestingly, the patients carrying the *VEGF* 936 CT genotype had tendency to have a smallest tumour size compared to carriers of the *VEGF* 936 CC genotype (figure 1 B, $p = 0.16$).

-Effect of *VEGF*, *KDR* and *FLT4* polymorphisms on survival of renal transplanted patients

Different survival times according to *VEGF*, *KDR* or *FLT4* polymorphisms in the best genetic models were estimated using the Kaplan-Meier method and then compared using the Log-rank test (supplementary table 2). No significant association was found between the polymorphisms tested and the survival of renal transplanted patients. However, interestingly, patients with the genotype *VEGF* 936 CT tended to have a better survival in comparison to the *VEGF* 936 CC genotype (figure 2; Log-rank $p = 0.12$). This result is in accordance with the protective effect of the allele *VEGF* 936 T obtained in the conditional multivariate regression analysis.

Discussion

In the present study, we investigated the effect of eight polymorphisms in *VEGF*, two polymorphisms in *KDR* and two polymorphisms in *FLT4* on risk of RCC and survival in renal transplanted patients. We also evaluated the effect of these polymorphisms on the RCC aggressiveness. We showed for the first time that the allele *VEGF* 936 T, located in the 3' UTR, is associated with a decreased risk of RCC (OR=0.14; CI 95%: 0.023-0.83; p=0.03 in the conditional multivariate regression analysis). Interestingly, patients carrying the *VEGF* 936 CT genotype tended to have an increased survival compared to the carriers of *VEGF* 936 CC genotype (Log-rank p=0.12). Concerning the aggressiveness, patients with the *VEGF* 936 CT genotype tended also to have a decreased tumour size than those with the CC genotype (p=0.16). We didn't find evidence for association between the other polymorphisms (SNPs or haplotypes) included in our study and risk of RCC or the survival. However, these polymorphisms must be genotyped in a largest renal transplanted population in order to confirm these results and, in particular to valid the protective effect the *VEGF* 936 T allele on the RCC risk.

Interestingly, the *VEGF* 936 T allele has also been implicated in a protective effect in breast cancer (Krippel et al. 2003; Jakubowska et al. 2008). In these studies, *VEGF* 936 CT and TT genotypes were associated with a significant decreased in VEGF plasma levels (Krippel et al. 2003; Jakubowska et al. 2008). A link between *VEGF* 936 T allele and VEGF concentrations was also demonstrated by Renner *et al.* in the general population (Renner et al. 2000). In this study, patients carrying the *VEGF* 936 CT or TT genotypes had a significantly lower plasma VEGF concentrations than the carriers of *VEGF* 936 CC genotype (9.1 vs. 28 pg/mL, p = 0.033). Several mechanisms have been proposed to explain this effect. Renner *et al.* have shown with bioinformatics' models that *VEGF* 936 C>T mutation leaded to the loss of a binding site for the AP-4 transcription factor (Renner et al. 2000). However, to date, no functional study has confirmed this hypothesis. Moreover, this polymorphism is located in the 3' UTR of the *VEGF* near to an ARE (adenylate-uridylate-rich elements) sequence which

plays an important role in the stability of *VEGF* mRNA (Levy et al. 1998). A linkage disequilibrium with a polymorphism located in this region could explain its effect on *VEGF* expression. More recently, Zhao *et al.* have shown in a study evaluating the effect of *VEGF* polymorphisms on the outcome of ischemic strokes the existence of a strong linkage disequilibrium between 936 C>T and 1451 C>T ($r^2=1$), both located in the 3' UTR of the *VEGF* (Zhao et al. 2017). Interestingly, *VEGF* 1451 C>T, which has been located in the predicted binding site of two microRNAs miR199a and miR199b, might affect *VEGF* mRNA stability. *In vitro* studies conducted in four different cell lines have shown that substitution of the 1451 C allele by the T allele decreased the luciferase activities. This result indicated a potential disruption of the miRNA-mRNA interaction resulting in lower *VEGF* expression (Zhao et al. 2017). This is in agreement with the precedent findings in breast cancer and with our results in renal transplanted patients. In our study, a measurement of *VEGF* plasma concentrations are required to confirm the effect of the *VEGF* 936 T allele on *VEGF* expression and to confirm its utility in the renal transplanted population.

Considering the crucial role of *VEGF* in RCC development and progression, *VEGF* genotyping could be helpful to personalize the screening for RCC according to the subgroup of risk which transplanted patients belong to. *VEGF* genotyping could also be considered in order to improve the management of immunosuppressive drugs in these patients. Indeed, several studies have suggested that CNI induce the expression of *VEGF* and favour tumour growth (Basu et al. 2008; Datta et al. 2009; Basu et al. 2010). Even if there is currently no recommendation to manage the immunosuppressive treatments after the diagnosis of RCC, a switch from CNI to mTOR inhibitors, which have antiproliferative and antiangiogenic properties, is frequently envisaged in medical practice (Geissler 2015; Cheung et al. 2017). In this context, *VEGF* genotyping could be considered to classify patients according to their risk of RCC and to personalize their immunosuppressive treatments. Although further validations in a largest population and additional functional studies are required to better

understand the role of *VEGF* 936 C>T, our first results suggest that *VEGF* 936 C>T could be helpful in this context.

References

- Basu, Aninda, Alan G. Contreras, Dipak Datta, Evelyn Flynn, Liling Zeng, Herbert T. Cohen, David M. Briscoe, and Soumitro Pal. 2008. "Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor and the Development of Post-Transplantation Cancer." *Cancer Research* 68 (14): 5689–98. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6603.
- Basu, Aninda, Dipak Datta, David Zurakowski, and Soumitro Pal. 2010. "Altered VEGF mRNA Stability Following Treatments with Immunosuppressive Agents: Implications for Cancer Development." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (33): 25196–202. doi:10.1074/jbc.M110.119446.
- Beuselinck, B., A. Karadimou, D. Lambrechts, B. Claes, P. Wolter, G. Couchy, J. Berkers, et al. 2013. "Single-Nucleotide Polymorphisms Associated with Outcome in Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Sunitinib." *British Journal of Cancer* 108 (4): 887–900. doi:10.1038/bjc.2012.548.
- Chapman, Jeremy R., Angela C. Webster, and Germaine Wong. 2013. "Cancer in the Transplant Recipient." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3 (7). doi:10.1101/cshperspect.a015677.
- Cheung, Chi Yuen, Maggie Kam Man Ma, Wai Leung Chak, Ka Foon Chau, and Sydney Chi Wai Tang. 2017. "Conversion to Mammalian Target of Rapamycin Inhibitors in Kidney Transplant Recipients with de Novo Cancers." *Oncotarget*, January. doi:10.18632/oncotarget.14908.
- Datta, Dipak, Alan G. Contreras, Aninda Basu, Olivier Dormond, Evelyn Flynn, David M. Briscoe, and Soumitro Pal. 2009. "Calcineurin Inhibitors Activate the Proto-Oncogene Ras and Promote Protumorigenic Signals in Renal Cancer Cells." *Cancer Research* 69 (23): 8902–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1404.
- Ellis, Lee M., and Daniel J. Hicklin. 2008. "VEGF-Targeted Therapy: Mechanisms of Anti-Tumour Activity." *Nature Reviews. Cancer* 8 (8): 579–91. doi:10.1038/nrc2403.
- Engels, Eric A., Ruth M. Pfeiffer, Joseph F. Fraumeni, Bertram L. Kasiske, Ajay K. Israni, Jon J. Snyder, Robert A. Wolfe, et al. 2011. "Spectrum of Cancer Risk among US Solid Organ Transplant Recipients." *JAMA* 306 (17): 1891–1901. doi:10.1001/jama.2011.1592.
- Euvrard, Sylvie, Emmanuel Morelon, Lionel Rostaing, Eric Goffin, Anabelle Brocard, Isabelle Tromme, Nilufer Broeders, et al. 2012. "Sirolimus and Secondary Skin-Cancer Prevention in Kidney Transplantation." *The New England Journal of Medicine* 367 (4): 329–39. doi:10.1056/NEJMoa1204166.
- Geissler, Edward K. 2015. "Post-Transplantation Malignancies: Here Today, Gone Tomorrow?" *Nature Reviews. Clinical Oncology* 12 (12): 705–17. doi:10.1038/nrclinonc.2015.186.
- Goel, Hira Lal, and Arthur M. Mercurio. 2013. "VEGF Targets the Tumour Cell." *Nature Reviews. Cancer* 13 (12): 871–82. doi:10.1038/nrc3627.
- Gong, Mancheng, Wenjing Dong, Zhirong Shi, Shaopeng Qiu, and Runqiang Yuan. 2017. "Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphisms and the Risk of Renal Cell Carcinoma: Evidence from Eight Case-Control Studies." *Oncotarget* 8 (5): 8447–58. doi:10.18632/oncotarget.14263.
- Hojo, M., T. Morimoto, M. Maluccio, T. Asano, K. Morimoto, M. Lagman, T. Shimbo, and M. Suthanthiran. 1999. "Cyclosporine Induces Cancer Progression by a Cell-Autonomous Mechanism." *Nature* 397 (6719): 530–34. doi:10.1038/17401.
- Jain, Lokesh, Craig A. Vargo, Romano Danesi, Tristan M. Sissung, Douglas K. Price, David Venzon, Jürgen Venitz, and William D. Figg. 2009. "The Role of Vascular Endothelial Growth Factor SNPs as Predictive and Prognostic Markers for Major Solid Tumors." *Molecular Cancer Therapeutics* 8 (9): 2496–2508. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0302.
- Jakubowska, Anna, Jacek Gronwald, Janusz Menkiszak, Bohdan Górski, Tomasz Huzarski, Tomasz Byrski, Lutz Edler, Jan Lubiński, Rodney J. Scott, and Ute Hamann. 2008.

- "The VEGF_936_C>T 3'UTR Polymorphism Reduces BRCA1-Associated Breast Cancer Risk in Polish Women." *Cancer Letters* 262 (1): 71–76. doi:10.1016/j.canlet.2007.11.029.
- Kasiske, Bertram L., Jon J. Snyder, David T. Gilbertson, and Changchun Wang. 2004. "Cancer after Kidney Transplantation in the United States." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4 (6): 905–13. doi:10.1111/j.1600-6143.2004.00450.x.
- Kauffman, H. Myron, Wida S. Cherikh, Yulin Cheng, Douglas W. Hanto, and Barry D. Kahan. 2005. "Maintenance Immunosuppression with Target-of-Rapamycin Inhibitors Is Associated with a Reduced Incidence of de Novo Malignancies." *Transplantation* 80 (7): 883–89.
- Knoll, Greg. 2008. "Trends in Kidney Transplantation over the Past Decade." *Drugs* 68 Suppl 1: 3–10.
- Knoll, Greg A., Madzouka B. Kokolo, Ranjeeta Mallick, Andrew Beck, Chieny D. Buenaventura, Robin Ducharme, Rashad Barsoum, et al. 2014. "Effect of Sirolimus on Malignancy and Survival after Kidney Transplantation: Systematic Review and Meta-Analysis of Individual Patient Data." *BMJ (Clinical Research Ed.)* 349 (November): g6679.
- Krippel, Peter, Uwe Langsenlehner, Wilfried Renner, Babak Yazdani-Biuki, Gerald Wolf, Thomas C. Wascher, Bernhard Paulweber, Josef Haas, and Hellmut Samonigg. 2003. "A Common 936 C/T Gene Polymorphism of Vascular Endothelial Growth Factor Is Associated with Decreased Breast Cancer Risk." *International Journal of Cancer* 106 (4): 468–71. doi:10.1002/ijc.11238.
- Lebranchu, Y., A. Thierry, O. Toupance, P. F. Westeel, I. Etienne, E. Thervet, B. Moulin, et al. 2009. "Efficacy on Renal Function of Early Conversion from Cyclosporine to Sirolimus 3 Months after Renal Transplantation: Concept Study." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9 (5): 1115–23. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02615.x.
- Levy, N. S., S. Chung, H. Furneaux, and A. P. Levy. 1998. "Hypoxic Stabilization of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA by the RNA-Binding Protein HuR." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (11): 6417–23.
- Renner, W., S. Kotschan, C. Hoffmann, B. Obermayer-Pietsch, and E. Pilger. 2000. "A Common 936 C/T Mutation in the Gene for Vascular Endothelial Growth Factor Is Associated with Vascular Endothelial Growth Factor Plasma Levels." *Journal of Vascular Research* 37 (6): 443–48. doi:54076.
- Rogers, Michael S., and Robert J. D'Amato. 2012. "Common Polymorphisms in Angiogenesis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (11). doi:10.1101/cshperspect.a006510.
- Scartozzi, M., M. Bianconi, L. Faloppi, C. Loretelli, A. Bittoni, M. Del Prete, R. Giampieri, et al. 2013. "VEGF and VEGFR Polymorphisms Affect Clinical Outcome in Advanced Renal Cell Carcinoma Patients Receiving First-Line Sunitinib." *British Journal of Cancer* 108 (5): 1126–32. doi:10.1038/bjc.2012.501.
- Walsh, Stephanie B., Jianmin Xu, Hui Xu, Ashish R. Kurundkar, Akhil Maheshwari, William E. Grizzle, Laura Timares, et al. 2011. "Cyclosporine a Mediates Pathogenesis of Aggressive Cutaneous Squamous Cell Carcinoma by Augmenting Epithelial-Mesenchymal Transition: Role of TGF β Signaling Pathway." *Molecular Carcinogenesis* 50 (7): 516–27. doi:10.1002/mc.20744.
- Zhao, Jing, Yun Bai, Lei Jin, Yingfeng Weng, Yujie Wang, Hui Wu, Xia Li, Ying Huang, and Shengyue Wang. 2017. "A Functional Variant in the 3'-UTR of VEGF Predicts the 90-Day Outcome of Ischemic Stroke in Chinese Patients." *PloS One* 12 (2): e0172709. doi:10.1371/journal.pone.0172709.
- Zhou, Alice Yao, and Sandra Ryeom. 2014. "Cyclosporin A Promotes Tumor Angiogenesis in a Calcineurin-Independent Manner by Increasing Mitochondrial Reactive Oxygen

Species." *Molecular Cancer Research: MCR* 12 (11): 1663–76. doi:10.1158/1541-7786.MCR-14-013

Table 1: Baseline characteristics of study population

Characteristics	Cases (n=30)	Controls (n=30)	p-value
Age at transplantation (years), mean (min-max)	49 (28-64)	48.2 (28-64)	0.72
Sex ratio (male/female)	1.5	1.5	1
Ethnic origin, n (%)			1
- Caucasian	25 (83.4%)	26 (86.7%)	
- African	1 (3.3%)	1 (3.3%)	
- Maghrebian	4 (13.3%)	3 (10.0%)	
Smoking status, n (%)			0.85
- Never smokers	14 (46.7%)	15 (50.0%)	
- Active smokers	6 (20.0%)	7 (23.3%)	
- Former smokers	10 (33.3%)	8 (26.7%)	
Primary cause of renal failure, n (%)			0.79
- Diabetes	1 (3.3%)	1 (3.3%)	
- Vascular nephropathy	2 (6.7%)	0 (0%)	
- Glomerulonephritis	16 (53.3%)	17 (56.7%)	
- Cystic kidney disease	3 (10.0%)	3 (10.0%)	
- Chronic interstitial nephritis	2 (6.7%)	5 (16.7%)	
- Hereditary cause	4 (13.3%)	3 (10.0%)	
- Other	2 (6.7%)	1 (3.3%)	
Antecedent of cancers, n (%)	3 (10.0%)	3 (10.0%)	1
Prior immunosuppressive treatment, n (%)	7 (23.3%)	4 (13.3%)	0.51
Time on dialysis before transplantation (month), mean (min-max)	38.2 (8-124)	40.4 (5-214)	1
Immunosuppressant exposure (days), mean (min-max)			
- Monoclonal antibody induction	4.6 (3-14)	5.4 (4-14)	0.37
- Polyclonal antibody induction	5.6 (4-8)	6.8 (4-19)	0.38
- Mycophenolic acid	2736.6 (146-4553)	3442.4 (330-4540)	0.044
- Prednisone	2703.8 (147-4533)	3248.6 (162-4540)	0.062
- Cyclosporine	2255.1 (515-4538)	2874.7 (3-4544)	0.21
- Tacrolimus	2032.0 (254-4221)	2935.8 (1449-4931)	0.14
- Sirolimus	2399.5 (1866-2933)	3710.3 (3312-4255)	0.22
- Everolimus	1094.6 (175-1987)	896	0.50
Post-transplant period (month), mean (min-max)	40.7 (4-140)	129.5 (59-150)	<0.01*

Table 2: Demographic and clinical features of RCC patients

Characteristics	Patients (n=30)
Age at cancer diagnosis (years), mean (min-max)	52.4 (29-71)
Histology, n (%)	
- Clear cell (ccRCC)	13 (43.3%)
- Papillary (pRCC)	11 (36.7%)
- Clear Cell Papillary (CCP RCC)	4 (13.3%)
- Other	2 (6.7%)
Tumour size (mm), mean (min-max)	20.5 (6-65)
Fuhrman grade, n (%)	
- I	1 (3.3%)
- II	17 (56.7%)
- III	8 (26.7%)
- IV	1 (3.3%)
- Unknown	3 (10.0%)
Treatment, n (%)	
- Surgery	29 (96.7%)
- Surgery and radiation therapy	1 (3.3%)
Cancer evolution, n (%)	
- Remission	27 (90.0%)
- Recurrence	2 (6.7%)
- Unknown	1 (3.3%)
Immunosuppressive drugs management after cancer diagnosis, n (%)	
- No modification	12 (40.0%)
- Switch from CNI to mTOR inhibitors	10 (33.33%)
- CNI dose reduction	4 (13.33%)
- CNI and/or MPA arrest	3 (10.0%)
- Other	1 (3.33%)

Table 3: Genotype and allele distributions of selected SNPs

Gene	Polymorphisms	Allelic frequencies (variant allele)	Genotype distributions			HWE, p
			Homozygous wt/wt, n/n	Heterozygous wt/m, n/n	Homozygous m/m, n/n	
<i>VEGF</i>	c.-2578 A>C	0.57	15/60	22/60	23/60	0.05
	c.-2489 C>T	0.43	23/60	22/60	15/60	0.05
	c.-460 C>T	0.55	15/60	24/60	21/60	0.14
	c.-1154 G>A	0.28	32/60	23/60	5/60	0.76
	c.-634 G>C	0.38	27/60	21/60	12/60	0.05
	c.-7 C>T	0.16	44/60	13/60	3/60	0.15
	c.936 C>T	0.14	43/60	17/60	0/60	0.20
	c.1612 G>A	0.48	18/60	26/60	16/60	0.31
<i>KDR</i>	c.1416 T>A	0.22	37/60	20/60	3/60	0.89
	c.889 G>A	0.15	43/60	16/60	1/60	0.72
<i>FLT4</i>	c.1480 A>G	0.07	53/60	6/60	1/60	0.13
	c.3971 G>T	0.08	51/60	9/60	0/60	0.53

wt: wild-type; m: mutated; HWE: Hardy–Weinberg equilibrium

Table 4 A: Conditional univariate analysis evaluating associations between *VEGF*, *KDR* or *FLT4* polymorphisms and risk of renal cell carcinoma

Variables	Category	Adjusted OR	Adjusted 95% CI	p-value
<i>VEGF</i> -2578A>C	CA vs. CC	1.82	0.46 - 7.20	0.39
	AA vs. CC	1.67	0.40 - 6.96	0.48
<i>VEGF</i> -2489 C>T	CT vs. CC	1.82	0.46 - 7.20	0.39
	TT vs. CC	1.67	0.40 - 6.96	0.48
<i>VEGF</i> -460C>T	CT vs. TT	1.62	0.46 - 5.53	0.44
	CC vs. TT	1.57	0.40 - 6.21	0.52
<i>VEGF</i> -2578A>C/-2489 C>T/-460C>T	ATC vs. CCT	1.17	0.61 - 2.25	0.63
<i>VEGF</i> -1154 G>A	AG vs. GG	3.93	0.83 - 18.70	0.09
	AA vs. GG	0.84	0.13 - 5.33	0.85
<i>VEGF</i> -634 G>C	GC vs. GG	0.58	0.11 - 2.98	0.52
	CC vs. GG	0.34	0.07 - 1.6	0.17
<i>VEGF</i> -7 C>T	CT vs. CC	1.67	0.40 - 6.97	0.48
	TT vs. CC	0.50	0.05 - 5.51	0.57
<i>VEGF</i> 936 C>T	CT vs. CC	0.18	0.04 - 0.82	0.03*
<i>VEGF</i> 1612 G>A	AG vs. GG	0.50	0.16 - 1.64	0.13
	AA vs. GG	1.95	0.44 - 8.70	0.94
<i>KDR</i> 1416 T>A	AT vs. TT	2.00	0.68 - 5.85	0.21
<i>KDR</i> 889 G>A	GA vs. GG	1.67	0.40 - 6.97	0.48
<i>FLT4</i> 1480 A>G	GA vs. AA	3.00	0.31 - 28.84	0.34
<i>FLT4</i> 3971 G>T	GT vs. GG	0.50	0.13 - 2.00	0.33

Table 4 B: Conditional multivariate analysis evaluating associations between genetic or non-genetic variables retained in the univariate model and risk of renal cell carcinoma

Variables	Category	Adjusted OR	Adjusted 95% CI	p-value
<i>VEGF</i> 936 C>T	T vs. C	0.14	0.023 - 0.83	0.03**
<i>VEGF</i> -1154 G>A	A vs. G	1.45	0.19 - 11.21	0.72
MPA exposure	per day increase	0.99	0.99 - 1.00	0.06

Figure 1A: Tumour size among VEGF -1154 G>A genotypes

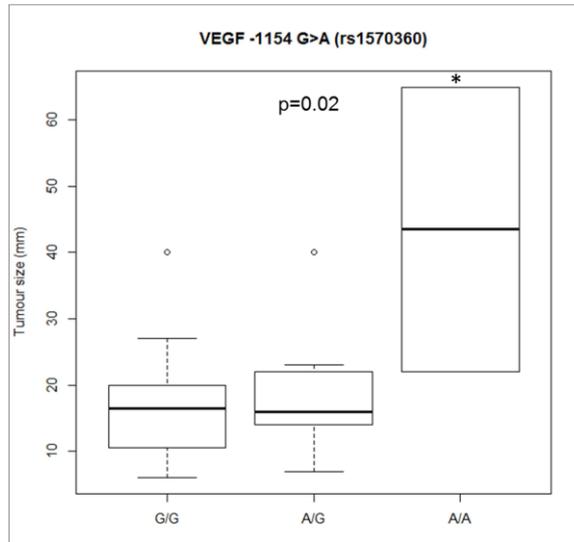


Figure 1B: Tumour size among VEGF 936 C>T genotypes

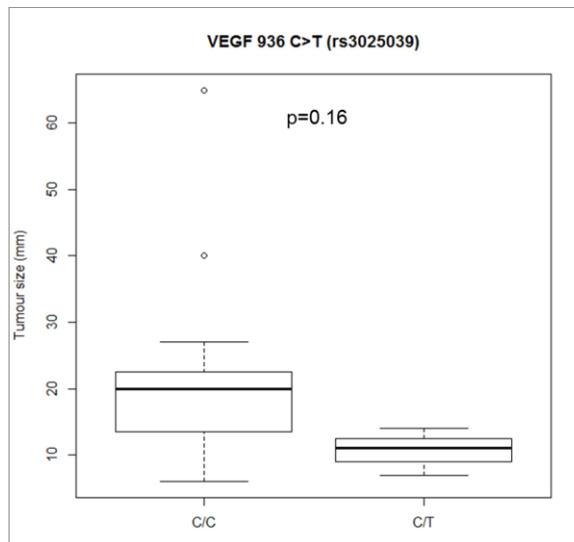
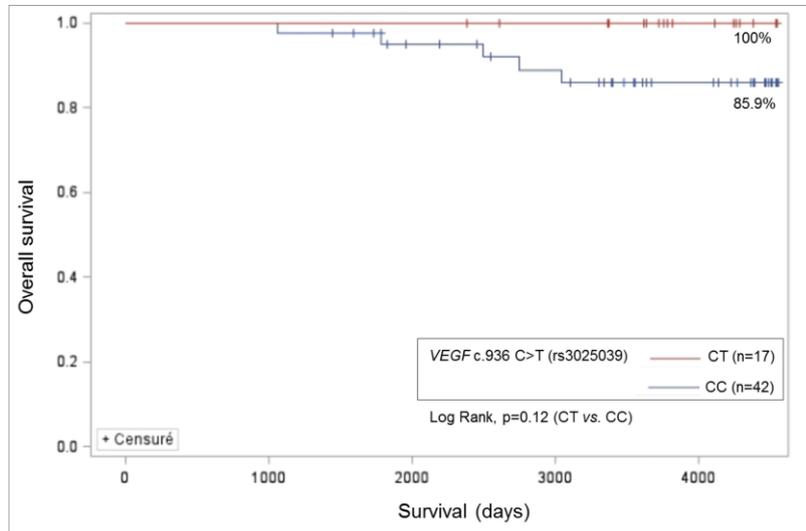


Figure 2: Kaplan-Meier curves showing survival of renal transplanted patients according to VEGF 936 C>T genotypes



Supplementary table 1: Conditional univariate analysis evaluating associations between non-genetic variables and risk of renal cell carcinoma

Variables	Category	Adjusted OR	Adjusted 95% CI	p-value
Ethnic origin		1.10	0.71 - 1.72	0.91
Smoking status		1.14	0.63 - 2.06	0.80
Primary cause of renal failure		1.00	0.75 - 1.36	0.99
Antecedent of cancer		1.00	0.06 - 15.99	1.00
Prior immunosuppressive treatment		2.00	0.50 - 7.99	0.33
Time on dialysis	per month increase	1.00	0.98 - 1.01	0.83
Monoclonal antibody exposure	per day increase	0.30	0 - ∞	1.00
Polyclonal antibody exposure	per day increase	0.85	0.58 - 1.25	1.00
Cyclosporine exposure	per day increase	1.00	0.99 - 1.00	0.53
Tacrolimus exposure	per day increase	0.97	0 - ∞	1.00
Everolimus exposure	per day increase	1.00	0 - ∞	1.00
Sirolimus exposure	per day increase	1.00	0 - ∞	1.00
MPA exposure	per day increase	1.00	0.99 - 1.01	0.06*
Prednisone exposure	per day increase	1.00	0.99 - 1.00	0.11

Supplementary table 2: Association between the *VEGF*, *KDR* or *FLT4* polymorphisms and survival of renal transplanted patients

Polymorphisms	Genetic model	Survival (%)	Log-rank p	
<i>VEGF</i> -2578 A>C	Dominant	CC	85.41	0.39
		AC + AA	93.75	
<i>VEGF</i> -2489 C>T	Dominant	CC	85.41	0.39
		CT + TT	93.75	
<i>VEGF</i> -460 C>T	Dominant	TT	84.44	0.31
		CT + CC	94.12	
<i>VEGF</i> -1154 G>A	Recessive	GG + GA	91.10	0.35
		AA	80.00	
<i>VEGF</i> -634 G>C	Recessive	GG + GC	92.57	0.30
		CC	82.50	
<i>VEGF</i> -7 C>T	Dominant	CC	86.85	0.17
		CT + TT	100.00	
<i>VEGF</i> 936 C>T	Codominant	CC	85.88	0.12
		CT	100.00	
<i>VEGF</i> 1612 G>A	Codominant	GG	80.95	0.36
		GA	95.83	
		AA	90.91	
<i>KDR</i> 1416 T>A	Codominant	AA	100.00	0.47
		AT	82.35	
<i>KDR</i> 889 G>A	Codominant	GG	92.25	0.50
		GA	84.62	
<i>FLT4</i> 1480 A>G	Dominant	AA	89.04	0.41
		GA + GG	100.00	
<i>FLT4</i> 3971 G>T	Codominant	GG	88.61	0.34
		GT	100.00	

Chapitre III : Discussion générale et conclusions

Au cours de ces dernières décennies, les complications néoplasiques sont devenues l'une des 3 principales causes de décès chez les patients transplantés. Bien que la progression des complications néoplasiques soit complexe et d'origine multifactorielle, elle semble étroitement liée à l'utilisation au long cours de certains médicaments immunosuppresseurs tels que les inhibiteurs de la calcineurine (ICN), représentés par la ciclosporine (CsA) et le tacrolimus. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'exposition aux ICN sur la signalisation angiogénique dans le RCC qui représente la deuxième cause de cancer chez les patients transplantés.

Nous avons étudié dans un premier temps l'impact de la CsA sur la régulation de la maturation et de la production des protéines sécrétées. En effet, plusieurs études ont mis en évidence l'impact de la CsA sur le repliement des protéines dans le RE via son interaction avec une PPIase localisée dans le RE, la cyclophiline B (Bernasconi et al., 2010; Lamoureux et al., 2012; Lodish and Kong, 1991; Price et al., 1994). Dans ces conditions, la capacité à déclencher une réponse UPR est essentielle afin de rétablir l'homéostasie cellulaire et garantir la fonctionnalité de la machinerie de sécrétion. Actuellement, peu d'études ont évalué l'impact de l'exposition de cellules cancéreuses à la CsA sur la protéostase et l'activation de l'UPR (Ciechomska et al., 2013; Ram and Ramakrishna, 2014). Aucune étude n'avait été effectuée dans le RCC, un cancer dont l'incidence est fortement augmentée après la transplantation rénale (Kasiske et al., 2004) et dont la progression est fortement régulée par l'action autocrine et paracrine du VEGF (Goel and Mercurio, 2013). Dans ce contexte, nous avons étudié l'impact de la CsA sur la protéostase et plus particulièrement sur la sécrétion du VEGF ; puis, nous avons examiné l'intérêt du ciblage de l'UPR (Bodeau et al., 2017). Ces résultats ont été obtenus avec des concentrations de CsA similaires à celles habituellement mesurées dans un contexte thérapeutique (Marquet, 2004). Nous avons montré que la CsA augmentait la production hypoxique du VEGF indépendamment de HIF dans 3 lignées

cellulaires de RCC (ACHN, CAKI-1 et 786-0). Plus généralement, la CsA augmente le niveau d'expression de l'ensemble des protéines néo-synthétisées dans les 3 lignées de RCC ayant un statut mutationnel différent vis-à-vis de *VHL*, *TP53* et *PTEN*. Ainsi, l'effet de la CsA sur la sécrétion du VEGF est d'avantage le reflet d'une action plus globale de la CsA sur la protéostase plutôt que celui d'un mécanisme de régulation transcriptionnel. Dans un deuxième temps, nous avons montré que la CsA activait la voie IRE1- α de l'UPR dans la lignée CAKI-1. Dans ces conditions, le ciblage de l'UPR, probablement activé par l'accumulation des protéines néo-synthétisées, a été envisagé dans notre étude. De façon intéressante, l'utilisation de la toyocamycine, un inhibiteur spécifique de la voie IRE1- α de l'UPR, permettait d'inhiber l'augmentation de la sécrétion de VEGF induite par la CsA. L'exposition simultanée des 3 lignées de RCC à la CsA et à la toyocamycine, permettant d'inhiber complètement leur croissance clonogénique, a confirmé le potentiel anti-oncogénique de la toyocamycine. Notre étude confirme l'intérêt du ciblage de l'UPR, de plus en plus étudié actuellement dans les cancers (Chen et al., 2014; Ri et al., 2012; Urra et al., 2016) et montre, pour la première fois, une application possible dans les cancers post-transplantation. Une étude complémentaire permettant d'approfondir la compréhension de l'effet de la CsA sur la protéostase et l'activation de l'UPR serait intéressante. Ceci nous conduit à proposer une étude pour mieux comprendre comment la CsA régule l'UPR, et pour détailler les conséquences de l'activation de l'UPR dans la carcinogenèse rénale. Pour cela, nous poursuivrons d'abord notre étude systématique de l'activation des différentes voies de l'UPR sur des cellules de RCC en culture. Les marqueurs analysés en blots permettront l'étude dynamique des différentes voies de l'UPR. Le rôle biologique de chacune des voies de l'UPR sera abordé au moyen de lignées dans lesquelles sera intégré un shRNA dirigé contre PERK, IRE1 α et ATF6. Nous testerons en parallèle la croissance clonogénique, l'induction de l'apoptose, la croissance cellulaire, la production du VEGF, qui est le principal facteur angiogénique impliqué dans le RCC. Nous

testerons l'effet de la CsA en normoxie et en hypoxie (1% O₂). Plusieurs travaux ont mis en évidence l'impact de la CsA sur le repliement des protéines via son interaction avec la cyclophiline B (Bernasconi et al., 2010; Lamoureux et al., 2012; Lodish and Kong, 1991; Price et al., 1994). Nous envisageons également d'évaluer l'effet de l'inhibition de la cyclophiline B sur l'activation de l'UPR, la sécrétion du VEGF et la production des protéines néo-synthétisées dans nos lignées de RCC. Une approche par siRNA sera envisagée pour inhiber l'expression de la cyclophiline B afin de vérifier notre hypothèse mécanistique et renforcer l'intérêt du ciblage de l'UPR dans les cancers post-transplantation.

Dans notre étude, le tacrolimus, un autre immunosuppresseur de la famille des ICN, n'avait aucun effet sur la sécrétion du VEGF, la production des protéines néo-synthétisées ou l'activation de l'UPR. L'action immunosuppressive du tacrolimus résulte de l'inhibition de l'activité phosphatase de la calcineurine après avoir formé un complexe avec une autre immunophiline cytoplasmique appelée FKBP12 (Clipstone and Crabtree, 1992). FKBP12 a, comme les cyclophilines, une activité PPIase et a été impliquée dans le repliement des protéines en catalysant la formation de ponts disulfures (Schreiber, 1991; Siekierka et al., 1989). Cependant, contrairement à la CsA, l'exposition à des concentrations thérapeutiques de tacrolimus ne semble pas avoir d'impact sur la protéostase et l'ER stress (Lamoureux et al., 2011; Ram and Ramakrishna, 2014). Il est probable que la localisation cytoplasmique de FKBP12 soit à l'origine de l'effet différentiel du tacrolimus sur la protéostase comparativement à la CsA. L'implication récente de FKBP13, localisée dans le RE, dans la fonctionnalité de la sécrétion des plasmocytes soutient cette hypothèse (Jeong et al., 2017; Partaledis and Berlin, 1993).

Ces premiers résultats sont intéressants. Cependant, ils ont été obtenus dans des lignées cellulaires de RCC exposées pendant de courte période à la CsA, ce qui constitue une limite évidente à ce travail. Nous envisageons de compléter cette première approche par une étude

ex vivo sur des fragments de tumeur de RCC en culture. Les patients transplantés développant un RCC sur un rein natif subissent une néphrectomie dans la totalité des cas ; l'obtention de fragments de tumeur est donc possible. Par ailleurs, un modèle de culture de fragments tumoraux développé au CHU d'Amiens dans l'hépatocarcinome (Godin et al., 2013) pourra facilement être transposé dans le cadre du RCC post-transplantation. Dans ces conditions, la poursuite de notre travail sur l'impact de la CsA sur la protéostase sur des fragments de tumeur de patients transplantés ayant développé un RCC paraît réalisable. Nous porterons un intérêt particulier à l'activation de la voie IRE1- α et de la protéine chaperonne BIP/GRP78 afin de confirmer nos premiers résultats. L'utilisation de ce modèle offre également de nouvelles perspectives. Il permettra de tenir compte de l'hétérogénéité des tumeurs et d'évaluer la variabilité inter-individuelle de réponse à la CsA. Nous pourrions également utiliser ce modèle pour étudier l'effet de l'exposition à la CsA sur de plus longues périodes afin de mimer l'effet d'une activation chronique de l'UPR dans les tissus. Enfin, l'exposition simultanée des tumeurs à la CsA et à un autre immunosuppresseur sera mise en œuvre pour rechercher d'éventuelles interactions pharmacodynamiques qui pourraient potentialiser la toxicité de la CsA. En effet, dans la pratique courante, les ICN sont utilisés en association avec d'autres médicaments immunosuppresseurs appartenant à la classe des anti-métabolites (tels que l'acide mycophénolique) ou des inhibiteurs de mTOR (évérolimus, sirolimus). Les ICN et les inhibiteurs de mTOR sont des substrats de la glycoprotéine P (P-gp), une protéine d'efflux ubiquitaire (Moes et al., 2015; Saeki et al., 1993). La P-gp étant exprimée au niveau des cellules tubulaires rénales, elle contribue à leur élimination urinaire et peut être à l'origine d'interactions pharmacodynamiques. Une augmentation de la néphrotoxicité de la CsA a ainsi été décrite en cas d'association avec le sirolimus chez le rat et chez le patient greffé (Podder et al., 2001). Dans ce contexte, il semble que la potentialisation de la toxicité de la CsA soit liée à une inhibition de la P-gp conduisant à une accumulation de la CsA dans les cellules

tubulaires rénales (Anglicheau et al., 2006). L'étude de ce type d'interaction pourrait également être envisagée dans le contexte du RCC post-transplantation.

Notre travail sur les lignées de RCC nous a permis de confirmer l'impact de la CsA sur la protéostase et de montrer son implication dans les cancers post-transplantation. L'activation chronique de l'UPR et, en particulier de la voie IRE1- α , conduisant à une surexpression de la protéine chaperonne BIP/GRP78 et à une augmentation de la production de VEGF en hypoxie, pourrait participer à l'agressivité des tumeurs. L'analyse *in silico* d'une cohorte de patients issus du TCGA consortium (<http://www.cbioportal.org/> (Gao et al., 2013)) nous a permis de confirmer l'importance de la fonctionnalité du compartiment de sécrétion dans des sous-groupes de patients ayant développé un RCC (Bodeau et al. Clinical Science, en révision). La surexpression de protéines régulatrices de l'UPR (XBP1 et ATF6) et de protéines chaperonnes (BIP/GRP78, cyclophiline B, ORP150, Calréticuline) a ainsi été corrélée à une diminution significative de la survie globale chez ces patients. Cela nous a conduit à sélectionner une liste de biomarqueurs candidats (GRP78/BIP, cyclophiline B, ERp57, Calréticuline) afin d'examiner de façon plus approfondie l'altération de la protéostase et la régulation de l'UPR chez les patients transplantés ayant développé un RCC (Bodeau et al. Clinical Science, en révision). Le VEGF et l'angiogénine, deux facteurs angiogéniques cruciaux dans la progression tumorale et régulés par l'UPR (Bouvier et al., 2012; Devisscher et al., 2016; Drogat et al., 2007; Ghosh et al., 2010; Miyake et al., 2015) ont également été inclus dans la liste des biomarqueurs candidats. Nous envisageons de quantifier ces biomarqueurs par une technique ELISA dans des sérums de patients transplantés ayant développé un RCC ou n'ayant développé aucun cancer. L'utilisation de séra prélevés avant et après la transplantation permettra d'examiner l'impact de la CsA sur la protéostase. La comparaison des concentrations de ces mêmes biomarqueurs entre des patients transplantés et

non-transplantés ayant développé un RCC permettra également de rechercher un profil d'expression de l'UPR caractéristique chez les patients transplantés. La sélection des biomarqueurs candidats, qui s'est basée essentiellement sur l'analyse de données publiées dans la littérature, constitue une limite à notre étude. Des approches plus innovantes de protéomiques et de génomiques devront parallèlement être envisagées. L'analyse des modifications du protéome et du sécrétome dans les cellules de RCC exposées à la CsA permettra de valider nos biomarqueurs candidats. Le séquençage génomique des tumeurs des patients transplantés ayant développé un RCC post-transplantation pourrait également être réalisé. En effet, les gènes codant pour les protéines régulatrices de l'UPR (*ERN1*-XBP1, *ATF6*-ATF6) sont mutés dans un nombre restreint de tumeurs (Chevet et al., 2015). La comparaison du statut mutationnel des tumeurs post-transplantation par rapport aux autres tumeurs constituerait ainsi une approche prometteuse pour rechercher une signature génétique chez les patients transplantés. L'utilisation de tels biomarqueurs permettrait d'améliorer le diagnostic des RCC post-transplantation et de tenir compte de l'hétérogénéité des tumeurs afin de choisir le traitement le plus approprié à chaque patient. Dans le domaine de la médecine personnalisée, d'autres approches, comme la pharmacogénétique, peuvent également être envisagées.

La pharmacogénétique étudie l'influence de la variabilité du génome sur la réponse à un médicament. Actuellement, certains génotypages sont réalisés dans la pratique médicale courante pour maximiser l'efficacité d'un traitement ou limiter l'apparition d'effets indésirables (Becquemont et al., 2011). En transplantation d'organe, le génotypage du *CYP3A5* représente l'un des meilleurs exemples d'utilisation de la pharmacogénétique dans la personnalisation du traitement (Thervet et al., 2010). Les patients métaboliseurs rapides, ayant un génotype *CYP3A5**1/*1, peuvent d'emblée bénéficier d'une augmentation de posologie de tacrolimus afin d'atteindre plus rapidement la zone des concentrations thérapeutiques

(Thervet et al., 2010). Dans le domaine des cancers post-transplantation, l'utilisation de la pharmacogénétique pour adapter le traitement immunosuppresseur des patients en fonction du risque de développer un cancer semble prometteuse. Dans le RCC post-transplantation, le *VEGF* et les *VEGFR* sont de bons gènes candidats. Le VEGF est un facteur de croissance crucial dans l'angiogenèse et la progression tumorale et a été fortement impliqué dans le développement du RCC (Goel and Mercurio, 2013; Gossage et al., 2015). Plusieurs études ayant examiné l'effet des ICN sur la progression des cancers post-transplantation ont montré que la CsA augmentait l'expression du VEGF et favoriserait ainsi la croissance tumorale (Basu et al., 2008, 2010; Datta et al., 2009). Il est donc possible que des polymorphismes dans le *VEGF* ou les *VEGFR* puissent affecter la réponse à des stimuli pro-angiogéniques et modifier la susceptibilité au RCC (Rogers and D'Amato, 2012). Les polymorphismes du *VEGF* ou des *VEGFR* ont déjà été étudiés dans le RCC dans la population générale (Gong et al., 2017; Rogers and D'Amato, 2012). Cependant, aucune étude n'a été menée chez les patients transplantés rénaux qui présentent un risque de RCC augmenté. Dans notre étude cas-témoin, nous avons examiné rétrospectivement l'association entre des polymorphismes dans les gènes du *VEGF* ou des *VEGFR* (*KDR* et *FLT4*) et le risque de développer un RCC post-transplantation ou l'agressivité des tumeurs. Ce travail a permis de montrer que l'allèle *VEGF* 936 T était associé à une diminution significative du risque de RCC post-transplantation (OR=0.14 ; IC 95% : 0.023-.83 ; p=0.03). Il est intéressant de constater que les patients ayant un génotype *VEGF* 936 CT avaient également tendance à avoir une survie augmentée par rapport aux patients porteurs d'un génotype CC. Concernant l'agressivité, une diminution de la taille de la tumeur a été observée chez les patients ayant un génotype *VEGF* 936 CT. Le rôle protecteur de l'allèle *VEGF* 936 T a été mis en évidence dans d'autres études ayant examiné l'association entre les polymorphismes du *VEGF* et le risque de cancer du sein (Jakubowska et al., 2008; Krippel et al., 2003). Dans ces études, une diminution significative

des concentrations circulantes de VEGF a été observée pour les patientes porteuses des génotypes *VEGF* 936 CT et TT. La même association avait préalablement été mise en évidence par Renner *et al.* dans la population générale (Renner *et al.*, 2000). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la diminution de l'expression du *VEGF* en présence de l'allèle 936 T. Des études utilisant des modèles bio-informatiques ont permis de localiser *VEGF* 936 C>T au niveau d'un site de fixation du facteur de transcription AP-4. Cependant, aucune étude fonctionnelle n'a actuellement permis de valider ce mécanisme. *VEGF* 936 C>T est localisé dans la région 3' UTR à proximité d'une séquence ARE ayant un rôle important dans la stabilité de l'ARNm du *VEGF* (Levy *et al.*, 1998). Un déséquilibre de liaison avec un polymorphisme situé dans cette séquence pourrait avoir un impact sur la fixation de HuR et diminuer la stabilité de l'ARNm du *VEGF*. Une étude récente ayant évalué l'association entre les polymorphismes du *VEGF* et le devenir des patients ayant développé un accident ischémique transitoire a décrit un déséquilibre de liaison total entre *VEGF* 936 C>T et *VEGF* 1451 C>T, localisé dans le site de fixation de miR199a et miR199b (Zhao *et al.*, 2017). Dans cette étude, la diminution de la fixation des miR199a et -199b en présence de l'allèle *VEGF* 1451 T a été confirmée par une analyse fonctionnelle *in vitro*. Ces études renforcent l'intérêt pour *VEGF* 936 C>T dans le contexte du RCC post-transplantation et nous incitent à poursuivre les génotypages du *VEGF* et des *VEGFR* dans une population de patients transplantés plus importante afin d'augmenter notre puissance statistique. Nous envisageons également d'examiner l'effet de *VEGF* 936 C>T sur l'expression du *VEGF* en mesurant les concentrations sériques de VEGF des patients inclus dans notre étude. Une étude fonctionnelle *in vitro* comparant l'activité luciférase d'un plasmide contenant la région 3' UTR du *VEGF* avec les allèles 936 C ou T permettrait également de confirmer l'effet de *VEGF* 936 C>T sur l'expression du VEGF.

D'un point de vue méthodologique, notre étude présente plusieurs limites. Notre approche étant de type gène candidat, nous avons retenu les polymorphismes du *VEGF* et des *VEGFR* s'ils avaient préalablement été associés à des modifications fonctionnelles *in vitro* ou à des manifestations cliniques. D'autres approches pan-génomiques s'intéressant à la variabilité de l'intégralité du génome peuvent actuellement être mises en œuvre. Cependant, elles nécessitent un grand nombre de patients pour garantir une puissance statistique adéquate et sont donc difficilement réalisables à petite échelle. Le nombre de patients inclus dans notre étude est assez restreint. Le nombre de sujets qui permettrait de garantir une puissance statistique optimale pour l'ensemble des polymorphismes inclus a été calculé à 120 patients. Cet objectif sera atteint prochainement grâce à l'inclusion de patients transplantés sur les sites de Lille et de Rouen. En revanche, même s'il s'agit d'une étude rétrospective, nous avons limité les inclusions dans le groupe des cas aux patients ayant eu un diagnostic de RCC prouvé par une biopsie. Par ailleurs, les cas et les témoins ont été appariés par l'âge, le sexe et le délai post-transplantation. Enfin, nous avons envisagé une étude d'association par polymorphisme et par haplotype.

L'utilisation des génotypes du *VEGF* afin d'adapter le traitement immunosuppresseur en fonction du risque de développer un cancer post-transplantation constitue une approche thérapeutique innovante. Même s'il est évident que des études supplémentaires doivent être menées, nos résultats indiquent que *VEGF* 936 C>T est intéressant dans le contexte du RCC post-transplantation. Ainsi, les génotypes de *VEGF* 936 C>T pourraient être utilisés pour classer les patients en fonction du risque de développer un RCC post-transplantation afin d'améliorer le dépistage et la gestion des traitements immunosuppresseurs. Les patients les plus à risque pourraient ainsi bénéficier d'un changement précoce de classe d'immunosuppresseur des ICN vers les inhibiteurs de mTOR (Cheung et al., 2017; Geissler, 2015; Holdaas et al., 2016).

En conclusion, ce travail nous a conduits à étudier de nouveaux aspects de la signalisation angiogénique dans le RCC post-transplantation. Dans ce domaine, l'activation de l'UPR, de plus en plus étudiée actuellement dans les cancers et impliquée dans la régulation du VEGF, ouvre de nouvelles perspectives dans le traitement et le diagnostic des cancers post-transplantation. Enfin, le génotypage du *VEGF* pourrait également être envisagé pour améliorer la gestion des traitements immunosuppresseurs. L'ensemble de ces travaux illustre ainsi l'intérêt de la modulation et du ciblage de la réponse angiogénique dans la personnalisation de la prise en charge du RCC post-transplantation.

Chapitre IV : Références bibliographiques

- Abe, A., Sato, K., Habuchi, T., Wang, L., Li, Z., Tsuchiya, N., Ohyama, C., Satoh, S., Ogawa, O., and Kato, T. (2002). Single nucleotide polymorphisms in the 3' untranslated region of vascular endothelial growth factor gene in Japanese population with or without renal cell carcinoma. *Tohoku J. Exp. Med.* *198*, 181–190.
- Ahlers, C., Kreideweiss, S., Nordheim, A., and Rühlmann, A. (1999). Cyclosporin A inhibits Ca²⁺-mediated upregulation of the DNA repair enzyme DNA polymerase β in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Biochem.* *264*, 952–959.
- Ajaz, S., Khaliq, S., Abid, A., Hassan, A.S., Hashmi, A., Sultan, G., Mohsin, R., Mubarrak, M., Naqvi, S.A.A., Rizvi, S.A.-H., et al. (2011). Association of a single-nucleotide polymorphism in the promoter region of the VEGF gene with the risk of renal cell carcinoma. *Genet. Test. Mol. Biomark.* *15*, 653–657.
- Andruska, N., Zheng, X., Yang, X., Helferich, W.G., and Shapiro, D.J. (2015). Anticipatory estrogen activation of the unfolded protein response is linked to cell proliferation and poor survival in estrogen receptor α -positive breast cancer. *Oncogene* *34*, 3760–3769.
- Anglicheau, D., Pallet, N., Rabant, M., Marquet, P., Cassinat, B., Méria, P., Beaune, P., Legendre, C., and Thervet, E. (2006). Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine-sirolimus interaction. *Kidney Int.* *70*, 1019–1025.
- Arcondéguy, T., Lacazette, E., Millevoi, S., Prats, H., and Touriol, C. (2013). VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic Acids Res.* *41*, 7997–8010.
- Basu, A., Contreras, A.G., Datta, D., Flynn, E., Zeng, L., Cohen, H.T., Briscoe, D.M., and Pal, S. (2008). Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor and the Development of Post-Transplantation Cancer. *Cancer Res.* *68*, 5689–5698.
- Basu, A., Datta, D., Zurakowski, D., and Pal, S. (2010). Altered VEGF mRNA Stability following Treatments with Immunosuppressive Agents: IMPLICATIONS FOR CANCER DEVELOPMENT. *J. Biol. Chem.* *285*, 25196–25202.
- Basu, A., Liu, T., Banerjee, P., Flynn, E., Zurakowski, D., Datta, D., Viklicky, O., Gasser, M., Waaga-Gasser, A.M., Yang, J., et al. (2012). Effectiveness of a combination therapy using calcineurin inhibitor and mTOR inhibitor in preventing allograft rejection and post-transplantation renal cancer progression. *Cancer Lett.* *321*, 179–186.
- Bates, D.O., Cui, T.-G., Doughty, J.M., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J.D., Peat, D., Gillatt, D., and Harper, S.J. (2002). VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* *62*, 4123–4131.
- Beck, B., Driessens, G., Goossens, S., Youssef, K.K., Kuchnio, A., Caauwe, A., Sotiropoulou, P.A., Loges, S., Lapouge, G., Candi, A., et al. (2011). A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature* *478*, 399–403.
- Becquemont, L., Alfirevic, A., Amstutz, U., Brauch, H., Jacqz-Aigrain, E., Laurent-Puig, P., Molina, M.A., Niemi, M., Schwab, M., Somogyi, A.A., et al. (2011). Practical recommendations for pharmacogenomics-based prescription: 2010 ESF-UB Conference on Pharmacogenetics and Pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* *12*, 113–124.

- Bernasconi, R., Soldà, T., Galli, C., Pertel, T., Luban, J., and Molinari, M. (2010). Cyclosporine A-sensitive, cyclophilin B-dependent endoplasmic reticulum-associated degradation. *PLoS One* 5 (9): e13008.
- Beuselinck, B., Karadimou, A., Lambrechts, D., Claes, B., Wolter, P., Couchy, G., Berkers, J., Paridaens, R., Schöffski, P., Méjean, A., et al. (2013). Single-nucleotide polymorphisms associated with outcome in metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *Br. J. Cancer* 108, 887–900.
- Bodeau, S., Sauzay, C., Nyga, R., Louandre, C., Descamps, V., François, C., Godin, C., Choukroun, G., and Galmiche, A. (2017). Targeting the Unfolded Protein Response as a Potential Therapeutic Strategy in Renal Carcinoma Cells Exposed to Cyclosporine A. *Anticancer Res.* 37, 1049–1057.
- Bornes, S., Prado-Lourenco, L., Bastide, A., Zanibellato, C., Iacovoni, J.S., Lacazette, E., Prats, A.-C., Touriol, C., and Prats, H. (2007). Translational induction of VEGF internal ribosome entry site elements during the early response to ischemic stress. *Circ. Res.* 100, 305–308.
- Bouvier, N., Fougeray, S., Beaune, P., Thervet, E., and Pallet, N. (2012). The unfolded protein response regulates an angiogenic response by the kidney epithelium during ischemic stress. *J. Biol. Chem.* 287, 14557–14568.
- Bretheau, D., Lechevallier, E., de Fromont, M., Sault, M.C., Rampal, M., and Coulanges, C. (1995). Prognostic value of nuclear grade of renal cell carcinoma. *Cancer* 76, 2543–2549.
- Brugarolas, J. (2014). Molecular genetics of clear-cell renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 32, 1968–1976.
- Bruyère, F., Hovens, C.M., Marson, M.-N., d’Arcier, B.F., Costello, A.J., Watier, H., Linassier, C., and Ohresser, M. (2010). VEGF polymorphisms are associated with an increasing risk of developing renal cell carcinoma. *J. Urol.* 184, 1273–1278.
- Bukrinsky, M. (2015). Extracellular cyclophilins in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 2087–2095.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2013). Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 499, 43–49.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Linehan, W.M., Spellman, P.T., Ricketts, C.J., Creighton, C.J., Fei, S.S., Davis, C., Wheeler, D.A., Murray, B.A., Schmidt, L., et al. (2016). Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 374, 135–145.
- Cao, Y., E, G., Wang, E., Pal, K., Dutta, S.K., Bar-Sagi, D., and Mukhopadhyay, D. (2012). VEGF exerts an angiogenesis-independent function in cancer cells to promote their malignant progression. *Cancer Res.* 72, 3912–3918.
- Chapman, J.R., Webster, A.C., and Wong, G. (2013). Cancer in the transplant recipient. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3 (7): a015677.

- Chen, X., Iliopoulos, D., Zhang, Q., Tang, Q., Greenblatt, M.B., Hatziapostolou, M., Lim, E., Tam, W.L., Ni, M., Chen, Y., et al. (2014). XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature* 508, 103–107.
- Cheung, C.Y., Ma, M.K.M., Chak, W.L., Chau, K.F., and Tang, S.C.W. (2017). Conversion to mammalian target of rapamycin inhibitors in kidney transplant recipients with de novo cancers. *Oncotarget* e14908.
- Chevet, E., Hetz, C., and Samali, A. (2015). Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer Discov.* 5, 586–597.
- Chignard, N., Shang, S., Wang, H., Marrero, J., Br  chot, C., Hanash, S., and Beretta, L. (2006). Cleavage of endoplasmic reticulum proteins in hepatocellular carcinoma: Detection of generated fragments in patient sera. *Gastroenterology* 130, 2010–2022.
- Ciechomska, I.A., Gabrusiewicz, K., Szczepankiewicz, A.A., and Kaminska, B. (2013). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy in malignant glioma cells undergoing cyclosporine a-induced cell death. *Oncogene* 32, 1518–1529.
- Clipstone, N.A., and Crabtree, G.R. (1992). Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357, 695–697.
- Cockman, M.E., Masson, N., Mole, D.R., Jaakkola, P., Chang, G.W., Clifford, S.C., Maher, E.R., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Maxwell, P.H. (2000). Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.* 275, 25733–25741.
- Cross, M.J., Dixelius, J., Matsumoto, T., and Claesson-Welsh, L. (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* 28, 488–494.
- Cullinan, S.B., and Diehl, J.A. (2004). PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 279, 20108–20117.
- Datta, D., Contreras, A.G., Basu, A., Dormond, O., Flynn, E., Briscoe, D.M., and Pal, S. (2009). Calcineurin inhibitors activate the proto-oncogene Ras and promote protumorigenic signals in renal cancer cells. *Cancer Res.* 69, 8902–8909.
- Dejeans, N., Mani  , S., Hetz, C., Bard, F., Hupp, T., Agostinis, P., Samali, A., and Chevet, E. (2014). Addicted to secrete - novel concepts and targets in cancer therapy. *Trends Mol. Med.* 20, 242–250.
- Devisscher, L., Vieri, M., Logue, S.E., Panse, J., Geerts, A., van Vlierberghe, H., Chevet, E., Gorman, A.M., Samali, A., and Kharabi Masouleh, B. (2016). Targeting the angioproteostasis network: Combining the forces against cancer. *Pharmacol. Ther.* 167, 1–12.
- Dornbusch, J., Walter, M., Gottschalk, A., Obaje, A., Junker, K., Ohlmann, C.-H., Meinhardt, M., Zacharis, A., Zastrow, S., Schoffer, O., et al. (2016). Evaluation of polymorphisms in angiogenesis-related genes as predictive and prognostic markers for sunitinib-treated metastatic renal cell carcinoma patients. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 142, 1171–1182.

- Drogat, B., Auguste, P., Nguyen, D.T., Bouchecareilh, M., Pineau, R., Nalbantoglu, J., Kaufman, R.J., Chevet, E., Bikfalvi, A., and Moenner, M. (2007). IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. *Cancer Res.* *67*, 6700–6707.
- Dufey, E., Urra, H., and Hetz, C. (2015). ER proteostasis addiction in cancer biology: Novel concepts. *Semin. Cancer Biol.* *33*, 40–47.
- Durinck, S., Stawiski, E.W., Pavía-Jiménez, A., Modrusan, Z., Kapur, P., Jaiswal, B.S., Zhang, N., Toffessi-Tcheuyap, V., Nguyen, T.T., Pahuja, K.B., et al. (2015). Spectrum of diverse genomic alterations define non-clear cell renal carcinoma subtypes. *Nat. Genet.* *47*, 13–21.
- Ellis, L.M., and Hicklin, D.J. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 579–591.
- Engels, E.A., Pfeiffer, R.M., Fraumeni, J.F., Kasiske, B.L., Israni, A.K., Snyder, J.J., Wolfe, R.A., Goodrich, N.P., Bayakly, A.R., Clarke, C.A., et al. (2011). Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA* *306*, 1891–1901.
- Escudier, B., Porta, C., Schmidinger, M., Rioux-Leclercq, N., Bex, A., Khoo, V., Gruenvald, V., Horwich, A., and ESMO Guidelines Committee (2016). Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* *27*, v58–v68.
- Euvrard, S., Morelon, E., Rostaing, L., Goffin, E., Brocard, A., Tromme, I., Broeders, N., del Marmol, V., Chatelet, V., Domp Martin, A., et al. (2012). Sirolimus and secondary skin-cancer prevention in kidney transplantation. *N. Engl. J. Med.* *367*, 329–339.
- Flanagan, W.M., Corthésy, B., Bram, R.J., and Crabtree, G.R. (1991). Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* *352*, 803–807.
- Fuhrman, S.A., Lasky, L.C., and Limas, C. (1982). Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* *6*, 655–663.
- Galmiche, A., Sauzay, C., Houessinon, A., Chauffert, B., and Pluquet, O. (2016). Probing Tumour Proteostasis and the UPR with Serum Markers. *Trends Cancer* *2*, 219–221.
- Galmiche, A., Sauzay, C., Chevet, E., and Pluquet, O. (2017). Role of the unfolded protein response in tumor cell characteristics and cancer outcome. *Curr. Opin. Oncol.* *29*, 41–47.
- Gao, J., Aksoy, B.A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S.O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., et al. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* *6*, pl1.
- Garcia-Donas, J., Esteban, E., Leandro-García, L.J., Castellano, D.E., del Alba, A.G., Climent, M.A., Arranz, J.A., Gallardo, E., Puente, J., Bellmunt, J., et al. (2011). Single nucleotide polymorphism associations with response and toxic effects in patients with advanced renal-cell carcinoma treated with first-line sunitinib: a multicentre, observational, prospective study. *Lancet Oncol.* *12*, 1143–1150.
- Geissler, E.K. (2015). Post-transplantation malignancies: here today, gone tomorrow? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *12*, 705–717.

- Ghosh, R., Lipson, K.L., Sargent, K.E., Mercurio, A.M., Hunt, J.S., Ron, D., and Urano, F. (2010). Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PloS One* 5, e9575.
- Gigante, M., Neuzillet, Y., Patard, J.-J., Tillou, X., Thuret, R., Branchereau, J., Timsit, M.-O., Terrier, N., Boutin, J.-M., Sallusto, F., et al. (2012). Renal cell carcinoma (RCC) arising in native kidneys of dialyzed and transplant patients: are they different entities? *BJU Int.* 110, E570-573.
- Gnarra, J.R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M.H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F., and Duh, F.M. (1994). Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat. Genet.* 7, 85–90.
- Godin, C., Dupont, S., Ezzoukhry, Z., Louandre, C., Chatelain, D., Henaut, L., Sabbagh, C., Regimbeau, J.-M., Maziere, J.-C., Barbare, J.-C., et al. (2013). Heterogeneous sensitivity of hepatocellular carcinoma to sorafenib revealed by the short-term culture of tumor fragments. *Anticancer Res.* 33, 1415–1420.
- Goel, H.L., and Mercurio, A.M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nat. Rev. Cancer* 13, 871–882.
- Goel, H.L., Chang, C., Pursell, B., Leav, I., Lyle, S., Xi, H.S., Hsieh, C.-C., Adisetiyo, H., Roy-Burman, P., Coleman, I.M., et al. (2012). VEGF/neuropilin-2 regulation of Bmi-1 and consequent repression of IGF-IR define a novel mechanism of aggressive prostate cancer. *Cancer Discov.* 2, 906–921.
- Gong, M., Dong, W., Shi, Z., Qiu, S., and Yuan, R. (2017). Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and the risk of renal cell carcinoma: Evidence from eight case-control studies. *Oncotarget* 8, 8447–8458.
- Gordan, J.D., Lal, P., Dondeti, V.R., Letrero, R., Parekh, K.N., Oquendo, C.E., Greenberg, R.A., Flaherty, K.T., Rathmell, W.K., Keith, B., et al. (2008). HIF-alpha effects on c-Myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. *Cancer Cell* 14, 435–446.
- Gossage, L., Eisen, T., and Maher, E.R. (2015). VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat. Rev. Cancer* 15, 55–64.
- Guba, M., von Breitenbuch, P., Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., Bruns, C.J., Zuelke, C., Farkas, S., Anthuber, M., et al. (2002). Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat. Med.* 8, 128–135.
- Halloran, P.F. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N. Engl. J. Med.* 351, 2715–2729.
- Han, S.W., Li, C., Ahn, K.O., Lim, S.W., Song, H.G., Jang, Y.S., Cho, Y.M., Jang, Y.M., Ghee, J.Y., Kim, J.Y., et al. (2008). Prolonged endoplasmic reticulum stress induces apoptotic cell death in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Am. J. Nephrol.* 28, 707–714.

- Hansen, W., Hutzler, M., Abel, S., Alter, C., Stockmann, C., Kliche, S., Albert, J., Sparwasser, T., Sakaguchi, S., Westendorf, A.M., et al. (2012). Neuropilin 1 deficiency on CD4+Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *J. Exp. Med.* *209*, 2001–2016.
- Harper, S.J., and Bates, D.O. (2008). VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat. Rev. Cancer* *8*, 880–887.
- Herman, M., Weinstein, T., Korzets, A., Chagnac, A., Ori, Y., Zevin, D., Malachi, T., and Gafter, U. (2001). Effect of cyclosporin A on DNA repair and cancer incidence in kidney transplant recipients. *J. Lab. Clin. Med.* *137*, 14–20.
- Hetz, C., Chevet, E., and Harding, H.P. (2013). Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* *12*, 703–719.
- Hojo, M., Morimoto, T., Maluccio, M., Asano, T., Morimoto, K., Lagman, M., Shimbo, T., and Suthanthiran, M. (1999). Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* *397*, 530–534.
- Holdaas, H., De Simone, P., and Zuckermann, A. (2016). Everolimus and Malignancy after Solid Organ Transplantation: A Clinical Update. *J. Transplant.* *2016*, 4369574.
- Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., and Weissman, J.S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J. Cell Biol.* *186*, 323–331.
- Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L.A., Keith, B., and Simon, M.C. (2003). Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 9361–9374.
- Hua, Z., Lv, Q., Ye, W., Wong, C.-K.A., Cai, G., Gu, D., Ji, Y., Zhao, C., Wang, J., Yang, B.B., et al. (2006). MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS One* *1*, e116.
- Jain, J., McCaffrey, P.G., Miner, Z., Kerppola, T.K., Lambert, J.N., Verdine, G.L., Curran, T., and Rao, A. (1993). The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* *365*, 352–355.
- Jain, L., Vargo, C.A., Danesi, R., Sissung, T.M., Price, D.K., Venzon, D., Venitz, J., and Figg, W.D. (2009). The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol. Cancer Ther.* *8*, 2496–2508.
- Jakubowska, A., Gronwald, J., Menkiszak, J., Górski, B., Huzarski, T., Byrski, T., Edler, L., Lubiński, J., Scott, R.J., and Hamann, U. (2008). The VEGF_936_C>T 3'UTR polymorphism reduces BRCA1-associated breast cancer risk in Polish women. *Cancer Lett.* *262*, 71–76.
- Jeong, M., Jang, E., Choi, S.S., Ji, C., Lee, K., and Youn, J. (2017). The Function of FK506-Binding Protein 13 in Protein Quality Control Protects Plasma Cells from Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Apoptosis. *Front. Immunol.* *8*, 222.
- Karaa, Z.S., Iacovoni, J.S., Bastide, A., Lacazette, E., Touriol, C., and Prats, H. (2009). The VEGF IRESes are differentially susceptible to translation inhibition by miR-16. *RNA* *15*, 249–254.

- Karali, E., Bellou, S., Stellas, D., Klinakis, A., Murphy, C., and Fotsis, T. (2014). VEGF Signals through ATF6 and PERK to promote endothelial cell survival and angiogenesis in the absence of ER stress. *Mol. Cell* 54, 559–572.
- Kasiske, B.L., Snyder, J.J., Gilbertson, D.T., and Wang, C. (2004). Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am. J. Transplant.* 4, 905–913.
- Kawai, Y., Sakano, S., Korenaga, Y., Eguchi, S., and Naito, K. (2007). Associations of single nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene with the characteristics and prognosis of renal cell carcinomas. *Eur. Urol.* 52, 1147–1155.
- Keith, B., Johnson, R.S., and Simon, M.C. (2011). HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat. Rev. Cancer* 12, 9–22.
- Knoll, G. (2008). Trends in kidney transplantation over the past decade. *Drugs* 68 *Suppl* 1, 3–10.
- Krippel, P., Langsenlehner, U., Renner, W., Yazdani-Biuki, B., Wolf, G., Wascher, T.C., Paulweber, B., Haas, J., and Samonigg, H. (2003). A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int. J. Cancer* 106, 468–471.
- Kuschal, C., Thoms, K.-M., Schubert, S., Schäfer, A., Boeckmann, L., Schön, M.P., and Emmert, S. (2012). Skin cancer in organ transplant recipients: effects of immunosuppressive medications on DNA repair. *Exp. Dermatol.* 21, 2–6.
- Lambrechts, D., Storkebaum, E., Morimoto, M., Del-Favero, J., Desmet, F., Marklund, S.L., Wyns, S., Thijs, V., Andersson, J., van Marion, I., et al. (2003). VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat. Genet.* 34, 383–394.
- Lamoureux, F., Mestre, E., Essig, M., Sauvage, F.L., Marquet, P., and Gastinel, L.N. (2011). Quantitative proteomic analysis of cyclosporine-induced toxicity in a human kidney cell line and comparison with tacrolimus. *J. Proteomics* 75, 677–694.
- Lamoureux, F., Gastinel, L.N., Mestre, E., Marquet, P., and Essig, M. (2012). Mapping cyclosporine-induced changes in protein secretion by renal cells using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). *J. Proteomics* 75, 3674–3687.
- Lee, H.H., Choi, K.H., Yang, S.C., and Han, W.K. (2012). Renal cell carcinoma in kidney transplant recipients and dialysis patients. *Korean J. Urol.* 53, 229–233.
- Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., and Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306–1309.
- Levey, A.S., and Coresh, J. (2012). Chronic kidney disease. *Lancet* 379, 165–180.
- Levy, N.S., Chung, S., Furneaux, H., and Levy, A.P. (1998). Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J. Biol. Chem.* 273, 6417–6423.

- Lodish, H.F., and Kong, N. (1991). Cyclosporin A inhibits an initial step in folding of transferrin within the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 266, 14835–14838.
- Lu, G., Dong, Y., Zhang, Q., Jiao, L., Yang, S., and Shen, B. (2015). Predictive value of vascular endothelial growth factor polymorphisms on the risk of renal cell carcinomas: a case-control study. *Tumour Biol.* 36, 8645–8652.
- Ma, N., Li, L.-W., and Cheng, J.-L. (2015). Predictive value of vascular endothelial growth factor polymorphisms on the clinical outcome of renal cell carcinoma patients. *Oncol. Lett.* 9, 651–656.
- Maluccio, M., Sharma, V., Lagman, M., Vyas, S., Yang, H., Li, B., and Suthanthiran, M. (2003). Tacrolimus enhances transforming growth factor-beta1 expression and promotes tumor progression. *Transplantation* 76, 597–602.
- Marquet, P. (2004). Suivi thérapeutique pharmacologique : pour l’adaptation de posologie des médicaments. Elsevier, 279-293.
- Maurel, M., Chevet, E., Tavernier, J., and Gerlo, S. (2014). Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem. Sci.* 39, 245–254.
- Meier-Kriesche, H.-U., Li, S., Gruessner, R.W.G., Fung, J.J., Bustami, R.T., Barr, M.L., and Leichtman, A.B. (2006). Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004. *Am. J. Transplant.* 6, 1111–1131.
- Minardi, D., Lucarini, G., Santoni, M., Mazzucchelli, R., Burattini, L., Pistelli, M., Bianconi, M., Di Primio, R., Scartozzi, M., Montironi, R., et al. (2013). VEGF expression and response to sunitinib in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 33, 5017–5022.
- Miyake, M., Goodison, S., Lawton, A., Gomes-Giacoia, E., and Rosser, C.J. (2015). Angiogenin promotes tumoral growth and angiogenesis by regulating matrix metalloproteinase-2 expression via the ERK1/2 pathway. *Oncogene* 34, 890–901.
- Moes, D.J.A.R., Guchelaar, H.-J., and de Fijter, J.W. (2015). Sirolimus and everolimus in kidney transplantation. *Drug Discov. Today* 20, 1243–1249.
- Moon, A., Rogers, A., Talbot, D., and Rix, D. (2015). Renal Cell Cancer in a European Regional Renal Transplant Population: Is There a Role for Immediate Native Renal Radiological Surveillance Before and After Transplantation? *Transplant. Proc.* 47, 1840–1844.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., and Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434, 652–658.
- Neuzillet, Y., Tillou, X., Mathieu, R., Long, J.-A., Gigante, M., Paparel, P., Poissonnier, L., Baumert, H., Escudier, B., Lang, H., et al. (2011). Renal cell carcinoma (RCC) in patients with end-stage renal disease exhibits many favourable clinical, pathologic, and outcome features compared with RCC in the general population. *Eur. Urol.* 60, 366–373.

- Ori, Y., Herman-Edelstein, M., Zingerman, B., Rozen-Zvi, B., Gafter, U., Malachi, T., and Gafter-Gvili, A. (2012). Effect of immunosuppressive drugs on spontaneous DNA repair in human peripheral blood mononuclear cells. *Biomed. Pharmacother.* *66*, 409–413.
- Pagès, G., and Pouysségur, J. (2005). Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors. *Cardiovasc. Res.* *65*, 564–573.
- Pallet, N., Bouvier, N., Bendjallah, A., Rabant, M., Flinois, J.P., Hertig, A., Legendre, C., Beaune, P., Thervet, E., and Anglicheau, D. (2008). Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am. J. Transplant.* *8*, 2283–2296.
- Partaledis, J.A., and Berlin, V. (1993). The FKB2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding the immunosuppressant-binding protein FKBP-13, is regulated in response to accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 5450–5454.
- Philippe, C., Dubrac, A., Quelen, C., Desquesnes, A., Van Den Berghe, L., Ségura, C., Filleron, T., Pyronnet, S., Prats, H., Brousset, P., et al. (2016). PERK mediates the IRES-dependent translational activation of mRNAs encoding angiogenic growth factors after ischemic stress. *Sci. Signal.* *9*, ra44.
- Podder, H., Stepkowski, S.M., Napoli, K.L., Clark, J., Verani, R.R., Chou, T.C., and Kahan, B.D. (2001). Pharmacokinetic interactions augment toxicities of sirolimus/cyclosporine combinations. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *12*, 1059–1071.
- Porta, C., Chiellino, S., Ferrari, A., Mariucci, S., and Liguigli, W. (2017). Pharmacotherapy for treating metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Expert Opin. Pharmacother.* *18*, 205–216.
- Price, E.R., Jin, M., Lim, D., Pati, S., Walsh, C.T., and McKeon, F.D. (1994). Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 3931–3935.
- Prud'homme, G.J., and Glinka, Y. (2012). Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* *3*, 921–939.
- Ram, B.M., and Ramakrishna, G. (2014). Endoplasmic reticulum vacuolation and unfolded protein response leading to paraptosis like cell death in cyclosporine A treated cancer cervix cells is mediated by cyclophilin B inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* *1843*, 2497–2512.
- Raval, R.R., Lau, K.W., Tran, M.G.B., Sowter, H.M., Mandriota, S.J., Li, J.-L., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Harris, A.L., and Ratcliffe, P.J. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 5675–5686.
- Rébillard, X., Grosclaude, P., Leone, N., Velten, M., Coureau, G., Villers, A., Irani, J., Leuret, T., Rigaud, J., Pfister, C., et al. (2013). [Incidence and mortality of urological cancers in 2012 in France]. *Progres En Urol.* *23 Suppl 2*, S57-65.

- Renner, W., Kotschan, S., Hoffmann, C., Obermayer-Pietsch, B., and Pilger, E. (2000). A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J. Vasc. Res.* *37*, 443–448.
- Ri, M., Tashiro, E., Oikawa, D., Shinjo, S., Tokuda, M., Yokouchi, Y., Narita, T., Masaki, A., Ito, A., Ding, J., et al. (2012). Identification of Toyocamycin, an agent cytotoxic for multiple myeloma cells, as a potent inhibitor of ER stress-induced XBP1 mRNA splicing. *Blood Cancer J.* *2*, e79.
- Rogers, M.S., and D'Amato, R.J. (2012). Common polymorphisms in angiogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a006510.
- Saeki, T., Ueda, K., Tanigawara, Y., Hori, R., and Komano, T. (1993). Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J. Biol. Chem.* *268*, 6077–6080.
- Sáenz-López, P., Vazquez, F., Cozar, J.M., Carretero, R., Garrido, F., and Ruiz-Cabello, F. (2013). VEGF polymorphisms are not associated with an increased risk of developing renal cell carcinoma in Spanish population. *Hum. Immunol.* *74*, 98–103.
- Samaniego, M., Becker, B.N., and Djamali, A. (2006). Drug insight: maintenance immunosuppression in kidney transplant recipients. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* *2*, 688–699.
- Sato, Y., Yoshizato, T., Shiraishi, Y., Maekawa, S., Okuno, Y., Kamura, T., Shimamura, T., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., Suzuki, H., et al. (2013). Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat. Genet.* *45*, 860–867.
- Scartozzi, M., Bianconi, M., Faloppi, L., Loretelli, C., Bittoni, A., Del Prete, M., Giampieri, R., Maccaroni, E., Nicoletti, S., Burattini, L., et al. (2013). VEGF and VEGFR polymorphisms affect clinical outcome in advanced renal cell carcinoma patients receiving first-line sunitinib. *Br. J. Cancer* *108*, 1126–1132.
- Schödel, J., Oikonomopoulos, S., Ragoussis, J., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Mole, D.R. (2011). High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by CHIP-seq. *Blood* *117*, e207-217.
- Schreiber, S.L. (1991). Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* *251*, 283–287.
- Senger, D.R. (2010). Vascular endothelial growth factor: much more than an angiogenesis factor. *Mol. Biol. Cell* *21*, 377–379.
- Shen, B.-L., Qu, Q.-S., Miao, S.-Z., and Zhang, Y.-X. (2015). Association between SNPs in vascular endothelial growth factor polymorphisms and risk of renal cell carcinoma: a case-control study. *Genet. Mol. Res.* *14*, 11119–11125.
- Shihab, F.S., Bennett, W.M., Isaac, J., Yi, H., and Andoh, T.F. (2003). Nitric oxide modulates vascular endothelial growth factor and receptors in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* *63*, 522–533.
- Siekierka, J.J., Hung, S.H., Poe, M., Lin, C.S., and Sigal, N.H. (1989). A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* *341*, 755–757.

- Sutter, C.H., Laughner, E., and Semenza, G.L. (2000). Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 4748–4753.
- Takagi, T., Kondo, T., Okumi, M., Ishida, H., and Tanabe, K. (2017). Differences in Clinical and Pathological Features of Renal Cell Carcinoma Between Japanese Patients After Kidney Transplantation and Those on Hemodialysis. *Ther. Apher. Dial.* *21*, 133–138.
- Takahashi, N., Hayano, T., and Suzuki, M. (1989). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* *337*, 473–475.
- Thervet, E., Lorient, M.A., Barbier, S., Buchler, M., Fichoux, M., Choukroun, G., Toupance, O., Touchard, G., Alberti, C., Le Pogamp, P., et al. (2010). Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clin. Pharmacol. Ther.* *87*, 721–726.
- Thoms, K.-M., Kuschal, C., Oetjen, E., Mori, T., Kobayashi, N., Laspe, P., Boeckmann, L., Schön, M.P., and Emmert, S. (2011). Cyclosporin A, but not everolimus, inhibits DNA repair mediated by calcineurin: implications for tumorigenesis under immunosuppression. *Exp. Dermatol.* *20*, 232–236.
- Tillou, X., Doerfler, A., Collon, S., Kleinclauss, F., Patard, J.-J., Badet, L., Barrou, B., Audet, M., Bensadoun, H., Berthoux, E., et al. (2012). De novo kidney graft tumors: results from a multicentric retrospective national study. *Am. J. Transplant.* *12*, 3308–3315.
- Urra, H., Dufey, E., Avril, T., Chevet, E., and Hetz, C. (2016). Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends Cancer* *2*, 252–262.
- van der Veldt, A.A.M., Eechoute, K., Gelderblom, H., Gietema, J., Guchelaar, H.-J., van Erp, N.P., van den Eertwegh, A.J.M., Haanen, J.B., Mathijssen, R.H.J., and Wessels, J.A.M. (2011). Genetic polymorphisms associated with a prolonged progression-free survival in patients with metastatic renal cell cancer treated with sunitinib. *Clin. Cancer Res.* *17*, 620–629.
- Walsh, S.B., Xu, J., Xu, H., Kurundkar, A.R., Maheshwari, A., Grizzle, W.E., Timares, L., Huang, C.C., Kopelovich, L., Elmets, C.A., et al. (2011). Cyclosporine a mediates pathogenesis of aggressive cutaneous squamous cell carcinoma by augmenting epithelial-mesenchymal transition: role of TGF β signaling pathway. *Mol. Carcinog.* *50*, 516–527.
- Wang, M., and Kaufman, R.J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 581–597.
- Wang, Y., Alam, G.N., Ning, Y., Visioli, F., Dong, Z., Nör, J.E., and Polverini, P.J. (2012). The unfolded protein response induces the angiogenic switch in human tumor cells through the PERK/ATF4 pathway. *Cancer Res.* *72*, 5396–5406.
- Webster, A.C., Craig, J.C., Simpson, J.M., Jones, M.P., and Chapman, J.R. (2007). Identifying high risk groups and quantifying absolute risk of cancer after kidney transplantation: a cohort study of 15,183 recipients. *Am. J. Transplant.* *7*, 2140–2151.
- Wong, G., and Chapman, J.R. (2008). Cancers after renal transplantation. *Transplant. Rev.* *22*, 141–149.

- Wu, X., Xin, Z., Zhang, W., Wu, J., Chen, K., Wang, H., Zhu, X., Pan, L., Li, Z., Li, H., et al. (2013). Polymorphisms in the VEGFA promoter are associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma by altering promoter activity. *Int. J. Cancer* *133*, 1085–1093.
- Xia, X., Lemieux, M.E., Li, W., Carroll, J.S., Brown, M., Liu, X.S., and Kung, A.L. (2009). Integrative analysis of HIF binding and transactivation reveals its role in maintaining histone methylation homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 4260–4265.
- Xian, W., Zheng, H., and Wu, W.J. (2015). Predictive value of vascular endothelial growth factor polymorphisms on the risk of renal cell carcinomas. *Genet. Mol. Res.* *14*, 7634–7642.
- Yang, Y.-Q., and Chen, J. (2014). Predictive role of vascular endothelial growth factor polymorphisms in the survival of renal cell carcinoma patients. *Genet. Mol. Res.* *13*, 5011–5017.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* *6*, 1355–1364.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* *107*, 881–891.
- Youle, R.J., and Narendra, D.P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 9–14.
- Zhao, J., Bai, Y., Jin, L., Weng, Y., Wang, Y., Wu, H., Li, X., Huang, Y., and Wang, S. (2017). A functional variant in the 3'-UTR of VEGF predicts the 90-day outcome of ischemic stroke in Chinese patients. *PLoS One* *12*, e0172709.
- Zhong, W., Wang, X., Pan, B., and Su, Z. (2014). Association of vascular endothelial growth factor polymorphisms with clinical outcome of renal cell carcinoma patients. *Tumour Biol.* *35*, 9839–9845.
- Zhou, A.Y., and Ryeom, S. (2014). Cyclosporin A promotes tumor angiogenesis in a calcineurin-independent manner by increasing mitochondrial reactive oxygen species. *Mol. Cancer Res.* *12*, 1663–1676.
- Zimmer, M., Doucette, D., Siddiqui, N., and Iliopoulos, O. (2004). Inhibition of hypoxia-inducible factor is sufficient for growth suppression of VHL^{-/-} tumors. *Mol. Cancer Res.* *2*, 89–95.
- Znaor, A., Lortet-Tieulent, J., Laversanne, M., Jemal, A., and Bray, F. (2015). International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *Eur. Urol.* *67*, 519–530.

Titre Modulation et ciblage du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) dans le carcinome à cellules rénales post-transplantation.

Résumé Au cours de ces dernières décennies, les complications néoplasiques sont devenues l'une des 3 principales causes de décès chez les patients transplantés. Bien que la progression des complications néoplasiques soit complexe et d'origine multifactorielle, elle semble étroitement liée à l'utilisation au long cours de certains médicaments immunosuppresseurs tels que les inhibiteurs de la calcineurine (ICN), représentés par la ciclosporine (CsA) et le tacrolimus. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'exposition aux ICN sur la signalisation angiogénique dans le carcinome à cellules rénales (renal cell carcinoma – RCC) qui représente la deuxième cause de cancer chez les patients transplantés. Nous avons examiné *in vitro* l'impact de l'exposition aux ICN sur la réponse UPR (Unfolded Protein Response) et la régulation des protéines sécrétées en portant un intérêt particulier à la régulation du VEGF (Vascular Endothelial Growth factor). Dans ce contexte, nous confirmons l'effet de la CsA sur la protéostase et montrons que l'activation de l'UPR par la CsA, conduisant à une augmentation de la production de VEGF en hypoxie, pourrait participer à l'agressivité des tumeurs. Nous proposons de rechercher certains biomarqueurs de l'UPR chez les patients ayant développé un RCC post-transplantation afin d'examiner de façon plus approfondie l'altération de la protéostase et la régulation de l'UPR et d'évaluer leurs utilisations dans le dépistage et le suivi du RCC post-transplantation. Dans le domaine de la médecine personnalisée, d'autres approches comme la pharmacogénétique sont désormais utilisées dans la pratique médicale. Dans ce contexte, nous avons évalué l'intérêt du génotypage du *VEGF* dans une cohorte de patients transplantés rénaux. Nous montrons que le polymorphisme *VEGF* 936 C>T est associé de façon significative au risque de développer un RCC post-transplantation. Même s'il est évident que des études supplémentaires doivent être menées, nos résultats indiquent que les génotypes de *VEGF* 936 C>T pourraient être intéressants pour classer les patients en fonction du risque de développer un RCC post-transplantation afin d'améliorer le dépistage et la gestion des traitements immunosuppresseurs.

Mots clés RCC post-transplantation ; VEGF ; UPR ; Ciclosporine ; polymorphismes génétiques.

Title Modulation and targeting of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in post-transplant renal cell carcinoma.

Abstract Over the past decades, neoplastic complications have become one of the 3 leading causes of death in transplanted patients. Although their progression is complex and probably multifactorial, it appears to be closely related to the long-term use of certain immunosuppressive drugs such as calcineurin inhibitors (CNI), represented by Cyclosporine A (CsA) and Tacrolimus. In this work, we investigated the impact of CNI exposure on angiogenic signaling in renal cell carcinoma (RCC), the second mostly observed cancer in transplanted patients. We examined *in vitro* the effect of CNI exposure on the Unfolded Protein Response (UPR) and the regulation of secreted proteins with a focus on VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) regulation. In this context, we confirm the effect of CsA on proteostasis and we show that the activation of UPR by CsA, leading to an increased VEGF hypoxic expression, could contribute to the aggressiveness of tumours. We propose to investigate a list of candidate UPR biomarkers in patients who have developed a post-transplant RCC in order to confirm the alteration of proteostasis and the UPR activation and to evaluate their use in post-transplant cancer screening and follow-up. In the field of personalized medicine, other approaches such as pharmacogenetics are now used in medical practice. In this context, we evaluated the *VEGF* genotyping in a cohort of renal transplanted patients. We show that *VEGF* 936 C>T is significantly associated with the risk of developing a post-transplant RCC. Although it is evident that additional studies need to be conducted, our results indicate that *VEGF* 936 C>T genotypes might be useful to classify patients according to their post-transplant RCC risk in order to improve RCC screening or immunosuppressive drugs management.

Key-words: post-transplant RCC, VEGF, UPR, Cyclosporine, Single nucleotide polymorphisms.