



**HAL**  
open science

# Rôle des microARNs dans le contrôle de l'hypersécrétion par les tumeurs neuroendocrines.

Ines Drissa

► **To cite this version:**

Ines Drissa. Rôle des microARNs dans le contrôle de l'hypersécrétion par les tumeurs neuroendocrines.. Endocrinologie et métabolisme. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMR096 . tel-04472913

**HAL Id: tel-04472913**

**<https://theses.hal.science/tel-04472913>**

Submitted on 22 Feb 2024

**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.



Normandie Université



# THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité **ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE**

Préparée au sein de l'**Université de Rouen Normandie**

**Role des microARNs dans le controle de l'hypersécrétion par les tumeurs neuroendocrines.**

Présentée et soutenue par  
**INES DRISSA**

**Thèse soutenue le 11/12/2023**  
devant le jury composé de :

MME GAELLE BONCOMPAIN	Directeur de Recherche - UNIVERSITE LYON 1 CLAUDE BERNARD	Rapporteur du jury
MME NADIA CHERRADI	Directeur de Recherche - UNIVERSITE GRENOBLE ALPES	Rapporteur du jury
M. CHRISTOPHE DENOYELLE	Maître de Conférences HDR - Université de Caen Normandie	Membre du jury
MME JUDITH FAVIER	Directeur de Recherche - UNIVERSITE PARIS 5 UNIVERSITE PARIS DESCARTES	Membre du jury
M. YOUSSEF ANOUAR	Directeur de Recherche - Université de Rouen Normandie	Président du jury
M. CHRISTOPHE DUBESSY	Maître de Conférences - Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par **CHRISTOPHE DUBESSY** (Neuroendocrine Endocrine and Germlinal Differentiation and Communication)



*À mes parents,*



# Remerciements

Je souhaite tout d'abord exprimer ma sincère gratitude envers les membres du jury de ma thèse pour avoir accepté d'évaluer ce travail ;

**Dr Nadia Cherradi**, Directrice de Recherche au Laboratoire de Biologie et Biotechnologies pour la Santé (CEA Grenoble) dont les recherches se concentrent sur l'exploration de l'implication des microARNs et des protéines kinases dans l'invasion cellulaire dans le carcinome corticosurrénalien et le cancer du rein à cellules claires, deux cancers agressifs fortement métastatiques.

**Dr Gaelle Boncompain**, Directrice de Recherche à l'Institut NeuroMyoGène (Université Claude Bernard, Lyon) qui se consacre à l'étude approfondie du trafic vésiculaire afin d'améliorer la compréhension des capacités d'adaptation de l'appareil de Golgi notamment lorsque des besoins sécrétoires sont requis.

**Dr Judith Favier**, Directrice de Recherche au Laboratoire PARCC, spécialisée dans la génétique et la biologie des phéochromocytomes et des paragangliomes et dont les recherches actuelles sont axées sur la découverte des mécanismes associés aux mutations dans les gènes codants pour la succinate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale.

**Dr Christophe Denoyelle**, Maître de conférences au Laboratoire Anticipe (CLCC François Baclesse, Caen) dont les recherches sont axées sur l'identification de longs ARN non codants et de microARNs associés aux cancers et notamment au cancer de l'ovaire.

Vos commentaires éclairés et vos précieux retours guideront mes efforts pour améliorer et affiner mon travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers le **Dr Youssef Anouar**, Directeur de Recherche à l'Université de Rouen et directeur de l'équipe PPN à laquelle j'appartiens. Je vous remercie pour vos retours toujours pertinents et vos encouragements, ainsi que d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

J'adresse également mes remerciements au **Pr Hervé Lefebvre** et au **Dr Jérôme Leprince**, directeur et co-directeur de l'unité Inserm 1239. Avec le Dr Youssef Anouar, vous avez mis à ma disposition toutes les ressources nécessaires pour mener à bien cette thèse dans un environnement optimal.

Je souhaite remercier l'ensemble des acteurs de l'école doctorale NBISE et notamment les directeurs adjoints rouennais le **Dr Magalie Lecourtois** et le **Pr Michaël Aubert**. Participer à la vie de l'école doctorale en tant que représentante élue des doctorants au cours de ma thèse a été une expérience très enrichissante et instructive.

Je souhaite également remercier l'équipe du **Dr Stéphane Gasman** et particulièrement le **Dr Laura Streit** avec qui nous avons collaboré pour ces deux articles. Merci également pour votre accueil chaleureux lors du congrès Exo-Endo, ce fut une expérience mémorable grâce à vous.

*J'ai toujours représenté la thèse comme une montagne majestueuse dont le sommet était difficilement perceptible. Le sentier escarpé de la recherche m'a souvent mise à l'épreuve mais chaque obstacle était surmontable grâce au soutien de certaines personnes que je souhaite remercier.*

Je n'aurais pas pu réaliser cette aventure périlleuse sans un bon mentor, le **Pr Christophe Dubessy**. Mes premiers souvenirs dans ce laboratoire sont liés aux entretiens avec Christophe où il me répétait qu'il fallait le tutoyer. J'avais l'image d'un maître de conférences certes accessible mais si exigeant et méticuleux qu'il me semblait inconcevable de le faire. Je n'avais pas tort en ce qui concerne sa rigueur, mais ce qui m'a le plus marquée ce sont sa bienveillance et sa pédagogie. Merci, Christophe, pour ces années si enrichissantes, j'ai beaucoup appris et mûri à tes côtés. Merci pour la confiance que tu m'as accordé pour développer ce projet, j'espère avoir été à la hauteur de tes attentes.

*J'ai eu la chance de réaliser cette thèse au sein l'équipe PPN et d'être ainsi entourée par des exemples de réussite et de détermination.*

**Pr Maïté Montero-Hadjadje** dont la pédagogie et la bienveillance ont marqué mes années de licence et de master. Cette influence positive s'est prolongée au cours de ces dernières années.

**Pr Laurent Yon, Dr Isabelle Lihrmann-Bisson et Dr Luca Grumolato** qui m'ont également marquée par leur rigueur scientifique. Je vous remercie pour ces échanges passionnants et enrichissants notamment lors de nos réunions d'équipe.

**Dorthe Cartier**, merci pour ton soutien quotidien et nos discussions en salle de culture qui m'ont particulièrement donné envie de découvrir le Danemark.

Le **Dr Lydie Jeandel** qui m'a marquée par sa positivité et sa bonne humeur à toute épreuve. Je n'oublierai jamais la fois où, après que tu as passé une journée (interminable) à extraire des cellules chromaffines de surrénales de bœuf, j'ai accidentellement aspiré le culot cellulaire et pouf, plus de cellules, plus de manip !

Cet environnement chaleureux n'aurait toutefois pas été le même sans mes compagnons de cordée, les **Drs Fanny Laguerre, Lina Riachy, Lisa Brunet, Cédric Jehan et Houssein Chhour**, qui ont été de véritables exemples de persévérance. La relève est assurée avec **Thomas Ferrand, Azénor Abgrall et Julie Dehedin**, les actuels doctorants de l'équipe. Nos petites conversations au détour d'un couloir ou entre deux tests de sécrétion égayaient instantanément mes journées.

Je souhaite également remercier les **Drs David Alexandre, Christine Bucharles, et Loubna Boukhzar** ainsi que **Marjorie Gras et Ji-Young Lee** pour leur sympathie et leur bienveillance.

*Mes sincères remerciements s'adressent également à l'ensemble des membres du laboratoire NorDiC qui ont grandement contribué à instaurer un environnement propice au travail et à la bonne humeur.*

**Catherine**, ton grand cœur se manifeste non seulement par ta bienveillance constante mais aussi par ton écoute attentive et tes mots toujours rassurants.

Les membres de l'équipe PSG portée par le **Pr Nathalie Rives** et le **Dr Michaël Thomas** dont les **Drs Estelle Louiset, Céline Duparc, Magali Basille-Dugay, Ludovic Dumont, Christine Rondanino, Isabelle Boutelet, Mohamed Skiba** et le **Pr Malika Skiba**.

Les membres de l'équipe REGPEP portée par le **Dr Nicolas Chartrel** et le **Pr Sergueï Fetissov** dont les **Drs Marie Picot et David Godefroy**, le **Pr Gaetan Prévost** et **Benjamin Lefranc**.

**Laurence Mateo, Sabrina Moreau et Nathalie Tassel** qui sont essentielles à ce laboratoire.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude envers les **Drs Sylvie Renouf et Valérie Turquier** (MCU, Université de Rouen) qui m'ont accordé leur confiance pour reprendre leurs enseignements dans le cadre de missions d'enseignement et d'un poste d'ATER. Votre accompagnement a rendu cette expérience particulièrement stimulante et formatrice.

Mes remerciements vont également à **Yamina Cherifi, Saloua Takhidjt et Fayrouz Khia**r pour leur bonne humeur contagieuse et ces bons moments partagés.

L'équipe « **We better than Me** » notamment composée de **Dr Cassandre Morel, Émilie Lahaye, Mélodie Devère, Laura Moutard, Frédérique Bateux**, ainsi que les **nouveaux doctorants**, l'organisation des journées de lab building a été l'occasion de renforcer nos liens. J'ai pu constater que votre dévouement pour votre thèse et notre laboratoire se manifeste également dans la planification de ces événements. Merci pour votre soutien précieux qui a contribué à rendre cette expérience inoubliable.

Je souhaite également remercier les membres de l'ex-laboratoire DC2N dont le **Pr Delphine Burel** et les membres de l'équipe « Génétique, biologie et plasticité des tumeurs cérébrales » (Inserm 1245) portée par le **Dr Hélène Castel** et notamment composée du **Pr Pierrick Gandolfo** et des **Drs Fabrice Morin, Oana Chever, Olivier Wurtz et Pascal Hilber**.

*Cette thèse n'aurait pas été la même sans mes compagnons de route, qui étaient là chaque jour pour partager nos réussites et nos échecs.*

**Dr Daniele Campisi**, exemple de persévérance, tu as été un pilier durant mes premières années de thèse. Évoluer à tes côtés m'a permis d'acquérir davantage confiance en mes capacités et à progresser. Je n'oublie pas non plus nos mémorables pauses-café qui ont largement contribué à mon addiction. Merci Dani.

L'équipe de choc, les **Drs Michael Alasoadura, Benyamine Mallouki, Mouna El Mehdi et Karthi Duraisamy** ainsi qu'**Axel Sonnet, Ishita Mishra et Lara Biny**. Merci pour ces moments inoubliables passés ensemble, que ce soit lors de nos repas à l'INSPE ou de nos soirées passées à rire. Je suis fière de voir le parcours de chacun d'entre vous.

L'équipe de sauvetage « **D3 en D-tres** », composée de **Dr Agalic Rodriguez-Duboc** et (futur **Dr Quentin Lemercier**), a été d'un soutien essentiel. Cette équipe a été particulièrement efficace lors des manips de qPCR où Quentin m'accompagnait à 19h pour surveiller le (méchant) robot et où Agalic m'assistait au téléphone à 20h pour le réparer. Votre présence quotidienne, agrémentée de mêmes et de discussions thérapeutiques, a considérablement adouci cette expérience. Les D3 ne seront bientôt plus en D-tres !

(Futur **Dr Lucie Prévost** dont la force de caractère m'impressionne, merci pour tes encouragements et tes choix musicaux inspirés lors de nos « musiques du jour »).

**Dr Emmanuel Laillet de Montullé** qui m'a marquée par sa passion pour l'enseignement (et par sa danse de scannage de porte), j'espère que tu es épanoui dans le nouveau chapitre de ta vie.

*Pour finir, je souhaite remercier mes compagnons de vie.*

(Futur **Dr Omayma Dlimi** ou tata Omayma, tu es un véritable soutien au quotidien. Lorsque je venais à ton bureau, tu ne savais jamais si c'était pour danser sur une musique de Gilberto Gil, te chanter du Georges Wassouf ou si j'avais besoin de partager de mes réflexions les plus récentes sur le monde qui nous entoure. J'ai également eu le privilège de te voir grandir au fil de ces années, et maintenant, il me tarde de te voir briller encore davantage dans l'avenir.

(Futur **Dr Hind Messaoudi**, dès notre rencontre, durant notre première année de master, j'ai immédiatement perçu en toi une personne déterminée et résiliente. C'est avec admiration que je constate ton évolution.

**Aïcha Djema**, l'une des plus belles personnes que je connaisse, merci pour tes mots toujours justes et réconfortants. Je suis très reconnaissante de t'avoir à mes côtés.

La **famille Ihsan, Saïda, Younes, Imène, Karima, Soraya, Sabrina, Kenza, Kadia et tant d'autres**, votre bonté et votre dévouement quotidien sont une source d'inspiration constante. Votre rencontre a indéniablement marqué un tournant dans ma vie.

**Emna, Nourane et Younes**, merci d'apporter tant de joie et d'amour à ma vie. (Aussi, il va falloir me trouver un autre surnom que « tata travail » svp.)

**Sabrina**, ma grande sœur, mon exemple, merci pour ton cœur aussi pur et ta présence qui m'est essentielle.

**Saber**, mon jumeau, mon repère, tu es l'un des plus grands bienfaits que j'ai eus dans ma vie. Merci pour votre soutien infaillible. Merci pour tout.

Mes **parents**, mes guides de vie, aucun mot ne saurait être suffisant pour exprimer mon amour et ma gratitude envers vous. Je réalise chaque jour le privilège et la bénédiction de vous avoir à mes côtés. Cette thèse vous est dédiée.



# Curriculum Vitæ

## Diplômes :

2019-2023 **Doctorat biologie** (*en cours*)

Rôle des microARNs dans le contrôle l'hypersécrétion par les tumeurs neuroendocrines

*Université de Rouen-Normandie, France*

2017-2019 **Master Biologie-Santé**

Parcours Cancer, Différenciation, Génétique et Biothérapies

*Université de Rouen-Normandie, France*

Mention Bien

2014-2017 **Licence Sciences de la Vie**

Parcours Biochimie, Biologie Moléculaire, Cellulaire et Physiologie

Option physiologie des grands systèmes, immunologie

*Université de Rouen-Normandie, France*

2013-2014 **Première Année Commune aux Études de Santé**

*Faculté de médecine de Rouen, France*

2013 **Baccalauréat** série S spécialité **Physique-Chimie**

*Lycée les Bruyères, Sotteville-lès-Rouen (76300), France*

Mention Bien, section européenne anglais

## Formation doctorale :

### Formation pédagogique des doctorants aux missions d'enseignement

- Prendre en compte des étudiants avec troubles spécifiques des apprentissages (6 heures)
- Accueillir des étudiants handicapés à l'université : cadre institutionnel et adaptations pédagogiques (6 heures)
- Utiliser la plate-forme UniversiTICE pour enseigner – Niveau 1 (6 heures)
- Utiliser la plate-forme UniversiTICE pour enseigner – Niveau 2 (6 heures)
- Escape Game de sensibilisation à l'innovation pédagogique dans l'enseignement supérieur (3 heures)
- Analyser en groupe des situations professionnelles (10 heures)
- Comprendre et expérimenter les mécanismes de la voix parlée pour s'exprimer en public (6 heures)

Responsable pédagogique : Catherine Yon-Morsel

*INSPE, Académie de Rouen-Normandie, France*

### Formations techniques et informatiques :

- Flexstation 3, lecteur de microplaques, C. Dubessy
- Leica SP8, microscope confocal à balayage laser, D. Schapman
- Robot de pipetage plaque 384/1536 et QuantStudio Flex, PCR quantitative, P. Lecras
- « Traitement de Masse des Données en biologie », L. Mouchard, (30 heures)
- « Analyse d'images sous ImageJ », D. Schapman, A. Lebon, (21 heures)

## Expériences d'enseignement :

### 2022-2023 **Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche**

- Structure et fonctions du génome, L3 BGST (cours magistraux)  
Responsable de l'U.E. : Dr. Valérie Turquier, Dr. Sylvie Renouf
  - Génétique des eucaryotes, L3 BBMCP / ESITECH (travaux dirigés)  
Responsable de l'U.E. : Dr. Christophe Dubessy
  - Communication du vivant, L1 BGE (cours magistraux et travaux dirigés)  
Responsable de l'U.E. : Dr. Christophe Dubessy
- Section 66 – Physiologie  
*Université de Rouen-Normandie, France*

### 2020-2022 **Missions enseignement (32hx2) et vacations**

- Découverte de laboratoire, M1 Neurosciences (travaux pratiques)  
Responsable de l'U.E. : Dr. Fabrice Morin
  - Zoologie fonctionnelle, L3 EBO/BGST (travaux pratiques)  
Responsables de l'U.E. : Dr. Sylvie Renouf, Dr. Guillaume Hermier
  - Physiologie Animale, L2 BGE (travaux pratiques)  
Responsable de l'U.E. : Dr. Pascal Hilber
- Université de Rouen-Normandie, France*

## Encadrements de stagiaires :

- A. Adnani, M2 Neurosciences, 2 mois (juin – juillet 2023)
- C. Bouiller, M1 Biologie-Santé, 2 mois (avril - mai 2021)
- S. Akar, M1 Neurosciences, 2 mois (avril - mai 2022)
- C. Mergaux, L3 BBMCP, 1 mois (juin 2021)
- D. Degoulet, L3 BBMCP, 1 mois (juin 2022)

## Expériences administratives :

### 2021 – 2022 **Représentante élue des doctorants au Conseil et Bureau de l'école doctorale**

- participation aux prises de décisions au cours des réunions des instances de l'école doctorale
- participation aux auditions préalables aux inscriptions en première année de doctorat
- participation à des réunions d'accueil des doctorants en première année de doctorat
- participation à des procédures de médiation lors de difficultés rencontrées au cours de thèses

*École doctorale EDnBISE 497*

### 2022 – 2023 **Représentante élue des doctorants au Conseil d'Unité**

*Inserm U1239, Université de Rouen-Normandie, France*

### 2021-2022 **Participation à deux missions de conseils pour la labélisation HRS4R**

- HRS4R ComUE : préparation de la lettre d'engagement à envoyer à la Commission européenne
- HRS4R Université Rouen-Normandie (groupe de travail 4 : formation et développement)

## 2021 **Représentante des doctorants lors de visites du comité HCERES**

- évaluation de l'école doctorale EDnBISE 497
- évaluation de l'unité DC2N - Inserm U1239
- évaluation de l'Université Rouen-Normandie, volet établissement

## **Expériences de recherche :**

depuis oct. 2019 **Doctorante**

« Rôle des microARN dans l'hypersécrétion de catécholamines par les tumeurs neuroendocrines »

Directeur de thèse : Dr. Christophe DUBESSY

*Inserm U1239, Université de Rouen-Normandie, France*

janv.- juin 2019 **Stagiaire Master 2<sup>ème</sup> année**

« Implication des microARN dans l'hypersécrétion de catécholamines par les phéochromocytomes »

Encadrant : Dr. Christophe DUBESSY

*Inserm U1239, Université de Rouen-Normandie, France*

avril-juin 2018 **Stagiaire Master 1<sup>ère</sup> année**

« Étude bioinformatique et expérimentale de l'impact sur l'épissage de variations identifiées sur des sites d'épissage reconnus par le spliceosome mineur »

Encadrante : Dr. Alexandra MARTINS

*Inserm U1245, UFR Médecine et Pharmacie de Rouen, France*

juillet 2017 **Stagiaire Licence 3<sup>ème</sup> année**

« Réalisation de dépistages fonctionnels lors d'une suspicion de mucoviscidose par étude du gène CFTR »

Encadrant : Dr. Taieb MESSAOUD

*Hôpital des enfants de Tunis, Tunisie*

## **Production scientifique :**

### Publications :

Houy S., Streit L., **Drissa I.**, Rame M., Decraene C., Moog S., Brunaud L., Lanoix J., Chelbi R., Bihain F., Lacomme S., Lomazzi S., Vix M., Mutter D., Paramithiotis E., Dubessy C., Vitale N., Ory S., Gasman S.

Dysfunction of calcium-regulated exocytosis at a single-cell level causes catecholamine hypersecretion in patient with pheochromocytoma.

*Cancer Letters* (<https://doi.org/10.1101/2021.11.02.466874>)

**Drissa I.**, Streit L., Cartier D, Wolf A., Quillet A., Yon L., Gasman S., Anouar Y., Dubessy C.

A set of miRNAs regulates exocytosis in pheochromocytoma, a neuroendocrine tumor  
(*en preparation*)

### Communications affichées :

**Drissa I.**, Quillet A., Tellier M.-C., Cartier D., Bérard C., Vergne N., Lecroq T., Courel M., Caron P., Tabarin A., Anouar Y., Yon L., Dubessy C. Deciphering the role of miRNAs in the control of catecholamines secretion by pheochromocytomas using a new highly sensitive test. Journées Normandes de la Recherche Biomédicale (JNRB). 2019. Rouen.

**Drissa I.**, Quillet A., Yon L., Anouar Y., Dubessy C. Deciphering the role of miRNA in the control of catecholamines secretion by pheochromocytomas. Congrès de neuroendocrinologie (BSE-SNE). 2021. Bordeaux (visioconférence).

Quillet A.\*, **Drissa I.\***, Tellier M.-C., Cartier D., Bérard C., Vergne N., Lecroq T., Courel M., Caron P., Tabarin A., Anouar Y., Yon L., Dubessy C. Rôle des microARNs dans l'hypersécrétion de catécholamines par les phéochromocytomes. Journée de l'axe 1 du Cancéropôle Nord-Ouest. 2020. Rouen (visioconférence). Prix du meilleur poster.

**Drissa I.**, Quillet A., Yon L., Anouar Y., Dubessy C. Deciphering the role of miRNA in the control of catecholamines secretion by pheochromocytomas. Journée des écoles doctorales (JED). 2021. Rouen (visioconférence).

**Drissa I.**, Quillet A., Yon L., Anouar Y., Dubessy C. Rôle des miARN dans l'hypersécrétion de catécholamines par les phéochromocytomes. Journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest. 2021. Deauville. Présélection 10 meilleurs posters

### Communications orales\* ou flash :

Quillet A.#, **Drissa I.#**, Tellier M.-C., Cartier D., Bérard C., Vergne N., Lecroq T., Courel M., Caron P., Tabarin A., Anouar Y., Yon L., Dubessy C. Rôle des microARNs dans l'hypersécrétion de catécholamines par les phéochromocytomes. Journée de l'axe 1 du Cancéropôle Nord-Ouest. 2020. Rouen (visioconférence).

**Drissa I.**, Quillet A., Yon L., Anouar Y., Dubessy C. Rôle des miARN dans l'hypersécrétion de catécholamines par les phéochromocytomes. Journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest. 2021. Deauville.

**Drissa I.**, Quillet A., Yon L., Anouar Y., Dubessy C. Deciphering the role of miRNA in the control of catecholamines secretion by pheochromocytomas. Journée annuelle du Club Exocytose-Endocytose. 2021. Rouen (visioconférence).

**Drissa I.**, Quillet A., Yon L., Anouar Y., Dubessy C. Identification of a subset of miRNAs as regulators of exocytosis in pheochromocytoma\* Journée annuelle du Club Exocytose-Endocytose. 2022. Munster

**Drissa I.**, Quillet A., Yon L., Anouar Y., Dubessy C. Identification of a subset of miRNAs as regulators of exocytosis in pheochromocytoma\* Journées Normandes de Recherche Biomédicale (JNRB). 2022. Rouen

**Drissa I.**, Streit L., Cartier D., Wolf A., Quillet A., Yon L., Gasman S., Anouar Y., Dubessy C. Exocytosis is regulated in miRNA in pheochromocytoma, a neuroendocrine tumor\* SNE. 45e Colloque de la Société de Neuroendocrinologie, 2023. Rouen

## Résumé

L'homéostasie est un phénomène essentiel permettant à l'organisme de maintenir un fonctionnement stable en dépit de perturbations internes et externes. Ces modifications continues compensatoires des fonctions corporelles sont notamment préservées par le système neuroendocrinien qui ajuste la production d'hormones de l'organisme. Parmi les cellules neuroendocrines impliquées, les cellules chromaffines de la médullosurrénale sécrètent des catécholamines en réponse au stress et permettent une réponse dite de « fight or flight » nécessaire à une distribution ajustée de l'énergie de l'organisme, notamment par des modulations au niveau cardiovasculaire. Ces catécholamines sont sécrétées via un processus de sécrétion régulée par le calcium se concluant par l'exocytose, étape essentielle de la libération d'hormone dans la circulation sanguine. Le phéochromocytome (PCC), une tumeur neuroendocrine rare de la médullosurrénale, est caractérisé par une hypersécrétion de catécholamines à l'origine de répercussions délétères sur la présentation de la maladie mais également susceptible d'influencer son diagnostic, son pronostic ainsi que sa prise en charge. Les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents à cette dérégulation sont toutefois peu connus. Mes travaux de thèse démontrent que cette hypersécrétion du PCC ne résulte pas seulement d'un effet de masse tumorale mais qu'elle implique également un dysfonctionnement à l'échelle de la cellule individuelle. En effet, ces cellules présentent une augmentation de l'activité d'exocytose, associée à une surexpression globale des gènes impliqués dans ce processus tant au niveau transcriptionnel que protéique. Nous nous sommes interrogés alors sur les potentiels régulateurs de cette hypersécrétion hormonale en exploitant la piste des microARN, des acteurs essentiels de l'homéostasie cellulaire. Nous avons alors montré le rôle majeur joué par un groupe de 20 microARN inhibiteurs post-transcriptionnels de l'expression des gènes de l'exocytose. Leur sous-expression globale dans le PCC est associée à la surexpression des gènes de l'exocytose et ainsi à la suractivation de la sécrétion de catécholamines. Ces études constituent un point de départ solide vers une meilleure compréhension de la physiopathologie des PCC et des tumeurs neuroendocrines, principalement caractérisés par une hypersécrétion hormonale.

Mots clés : exocytose, microARN, phéochromocytome, sécrétion régulée par le calcium

## Summary

Homeostasis, a vital phenomenon, enables the body to maintain stable functioning even in the face of internal and external disturbances. The continual compensatory adjustments in bodily functions are primarily governed by the neuroendocrine system, which regulates the production of hormones within the body. Among the neuroendocrine cells involved, chromaffin cells of the adrenal medulla gland respond to stress by secreting catecholamines. This “fight or flight” response is critical for the balanced distribution of the body's energy, particularly through cardiovascular modulations. These catecholamines are released through a calcium-regulated secretion process, culminating in exocytosis, the final step in hormone release into the bloodstream. Pheochromocytoma (PCC), a rare neuroendocrine tumor of the adrenal medulla gland, is characterized by an overproduction of catecholamines, which has deleterious effects on disease presentation and potential implications for diagnosis, prognosis, and management. However, the underlying molecular and cellular mechanisms of this dysregulation are not well understood. We have demonstrated that the hypersecretion in PCC is not solely due to the tumor burden but also involves dysfunction at the individual cell level. These cells demonstrate increased exocytosis activity, associated with an overexpression of genes related to this process, both at the transcriptional and protein levels. To explore potential regulators of this hormonal hypersecretion, we investigated the role of microRNAs, which are essential post-transcriptional modulators of cellular homeostasis. Our studies have highlighted the significant role played by a group of 20 post-transcriptional inhibitors microRNAs in the expression of exocytosis-related genes. Their overall underexpression in PCC is associated with the overexpression of exocytosis-related genes and, consequently, the hyperactivation of catecholamine secretion. These studies represent a solid foundation for a better understanding of the pathophysiology of PCC and neuroendocrine tumors, which are primarily characterized by hormonal hypersecretion.

Keywords: exocytosis, microRNA, pheochromocytoma, calcium-regulated secretion

# Table des matières

Remerciements	1
Curriculum Vitæ	4
Résumé	8
Summary	9
Table des matières	10
Liste des abréviations	13
Table des illustrations	17
Liste des tableaux	18
Introduction	19
1. Physiologie du système neuroendocrinien	19
1.1. Milieu intérieur et homéostasie	19
1.2. Le système neuroendocrinien, acteur de l'homéostasie	19
1.2.1. Introduction	19
1.2.2. Cellules neuroendocrines	20
1.3. Régulation des processus biologiques par le système neuroendocrinien	21
1.4. « Fight or flight » et système sympatho-surrénalien	22
1.4.1. « Fight or flight »	22
1.4.2. Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien	23
1.4.3. Catécholamines, unité fonctionnelle du système sympatho-surrénalien	24
1.4.3.1. Biosynthèse des catécholamines	24
1.4.3.2. Tissus cibles des catécholamines	26
1.4.3.3. Catabolisme des catécholamines	27
1.4.4. La glande surrénale, protagoniste essentiel du maintien de l'homéostasie	27
1.4.5. Stimulation de la médulla et sécrétion de catécholamines	29
1.4.6. Voie de la sécrétion régulée des cellules chromaffines	30
1.4.6.1. Cellules chromaffines, modèle d'étude de la voie de la sécrétion régulée	30
1.4.6.2. Les granules de sécrétion à cœur dense, unité du trafic membrane	31
1.4.6.3. Biosynthèse des hormones et neuropeptides et sécrétion	32
1.4.6.4. Biogenèse des granules de sécrétion à cœur dense de la voie régulée	33
1.4.6.5. Maturation et transport des granules de sécrétion à cœur dense	35
1.4.6.6. Exocytose des granules de sécrétion à cœur dense	36
1.4.6.7. Couplage exocytose-endocytose	41

2.	Dérégulation de l'homéostasie dans les tumeurs neuroendocrines, cas du phéochromocytome	43
2.1.	Tumeurs neuroendocrines et rupture de l'homéostasie	43
2.2.	Le phéochromocytome, une tumeur neuroendocrine hypersécrétante	44
2.2.1.	Histoire du premier cas de phéochromocytome observé	44
2.2.2.	Le PPGL, une tumeur de la cellule chromaffine	44
2.2.3.	Hypersécrétion de catécholamines et symptômes du PPGL	45
2.2.4.	Diagnostic du PPGL	47
2.2.5.	Le PPGL métastatique, un diagnostic impossible ?	49
2.2.6.	Traitements du PPGL	50
2.2.7.	Génétique du PPGL	52
2.2.7.1.	Retour sur le cas de Minna Roll	52
2.2.7.2.	Formes sporadiques et familiales du PPGL	52
2.2.7.3.	Clusterisation génétique du PPGL	54
2.2.7.4.	Impact de la génétique sur la présentation du PPGL	55
2.2.8.	Régulation épigénétique et post-transcriptionnelle du PPGL	59
3.	Les microARN, des régulateurs internes de l'homéostasie	61
3.1.	Les miARN, acteurs de l'évolution	61
3.2.	Les miARN, des régulateurs de l'homéostasie	62
3.3.	Biogenèse des miARN	64
3.3.1.	Transcription des miARN	64
3.3.2.	Maturation nucléaire des miARN	65
3.3.3.	Export nucléaire et maturation cytoplasmique des miARN	67
3.4.	Mécanismes d'action des miARN	69
3.4.1.	Formation du complexe d'inhibition des ARN	69
3.4.2.	Mécanisme d'action de miRISC	70
3.5.	Stratégies expérimentales et bioinformatiques pour l'identification des cibles des miARN	73
3.6.	Implication des miARN dans les cancers	74
3.7.	Implication des miARN dans les TNE, cas du PPGL	76
3.8.	Identification de miARN régulateurs de la sécrétion hormonale	77
	Objectifs de thèse	83
	Résultats	85
1.	Le dysfonctionnement de l'exocytose régulée par le calcium au niveau de la cellule unique provoque une hypersécrétion de catécholamines chez les patients atteints d'un phéochromocytome	85
2.	Identification d'un ensemble de miARN impliqués dans la dérégulation de l'exocytose dans le phéochromocytome	89



Discussion	91
1. ExoDB, un outil pertinent pour l'identification de miARN régulateurs de l'exocytose ?	91
2. Importance des bases de données transcriptomiques pour l'identification des gènes et des miARN dérégulés dans le PCC	92
3. Validation d'un réseau de miARN et de gènes impliqués dans l'exocytose	94
4. Approfondissement de l'évaluation du rôle des miARN dans la sécrétion régulée	95
5. miR-34a-5p, un microARN suppresseur de tumeur ?	96
6. Implication des miARN dans l'hypertension artérielle	98
7. Quid des autres cibles des miARN d'intérêt ?	99
8. Quid des autres régulateurs épigénétiques et post-transcriptionnels ?	100
9. La lignée PC12-2luc, un outil cellulaire de quantification de la sécrétion régulée	102
10. Lien entre l'hypersécrétion du PCC et son développement tumoral ?	106
Conclusion	109
Références bibliographiques	111

## Liste des abréviations

5-HT	5-hydrotryptamine
AA	Acides Aminés
AADC	<i>Aromatic Amino Acid Decarboxylase</i>
ACTH	<i>Adreno CorticoTropic Hormone</i>
Ago	Argonaute
Akt	<i>serine/threonine kinase 1</i>
APUD	<i>Amine Precursor Uptake and Decarboxylation</i>
ARNdb	ARN double brin
ARNsb	ARN simple brin
ARNt	ARN de transfert
ASES	<i>Age, Size, Extra-adrenal location, Secretory type</i>
ATP	Adénosine TriPhosphate
ATP6V0A1	<i>ATPase H<sup>+</sup> transporting V0 subunit A1</i>
bpm	battements par minute
Braf	<i>B-raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
Bsn	Bassoon
Caps	Calciphosine
Cask	<i>Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase</i>
CCND1	Cycline D1
Ccr4	<i>C-C chemokine receptor 4</i>
CgA, CgB	Chromogranines A et B
CGH array	<i>comparative genomic hybridization array</i>
circARN	ARN circulaire
CLASH	<i>Cross-Linking, Ligation and Sequencing of Hybrids</i>
CLIP-seq	<i>Cross-Linking and Immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing</i>
COMETE	CORTICO et MEDULLOSURRÉNALE : les Tumeurs Endocrines
COMT	Catéchol-O-MéthylTransférase
COPP	<i>COMposite Pheochromocytoma/Paraganglioma Prognostic</i>
CPI	Complexe de Pré-Initiation
Cplx	Complexine
CRH	<i>Corticotropin-Realising Hormone</i>
CSDE1	<i>Cold Shock Domain-containing E1</i>
CSP alpha	<i>Cold Shock Protein alpha</i>
CT-scan	<i>Computed Tomography scan</i>
DAG	DiAcylGlycérol
DB	<i>data base</i>
DBH	Dopamine β-Hydroxylase
DCP2	<i>Decapping Protein 2</i>
Ddx6	<i>DEAD-Box helicase 6</i>
Dgcr8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
DLK1-MEG3	<i>Delta-Like 1 homolog-maternally expressed 3</i>
DLST	DihydroLipoamide S-succinylTransférase
Doc2b	<i>Double c2 domain β</i>
DRD2	<i>Dopamine Receptor D2</i>
Edc4	<i>Enhancer of mRNA decapping protein 4</i>
EGLN1/2	<i>egl-9 family hypoxia inducible factor 1/2</i>

eIF4E	<i>eukaryotic Initiation Factor 4E</i>
Elk	<i>ETS transcription factor</i>
Erf	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
F-actine	Filaments d'actine
F-FDG	F-fluorodésoxyglucose
F-FDOPA	F-fluorodihydroxyphénylalanine
FBL	<i>FeedBack Loop</i>
FFL	<i>FeedFoward Loop</i>
FGFR1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
FH	Fumarate Hydroxylase
Fluc	Firefly luciférase
FT	facteur de transcription
GAPP	<i>Grading system of Adrenal Pheochromocytoma and Paraganglioma</i>
GOT2	<i>Glutamate Oxaloacetate Transaminase 2</i>
GSCD	Granules de Sécrétion à Cœur Dense
GSI	Granules Sécrétoires Immatures
GSM	Granules Sécrétoires Matures
GTE <sub>x</sub>	<i>Genotype-Tissue Expression</i>
hGH1	<i>human Growth Hormone 1</i>
HIF	<i>Hypoxia Induced Factor</i>
hTERT	<i>human TElomerase Reverse Transcriptase</i>
IDH1/2	Isocitrate DésHydrogénase 1/2
IL-1 $\beta$	Interleukine 1 $\beta$
IRM	Imagerie par Raisonance Magnétique
IRP	<i>Iron Regulatory Protein</i>
JMJD	<i>JuMonJi C Domain-containing</i>
K1F1B	<i>Kinesin Family member 1B</i>
knockout	KO
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphénylalanine
LAT1/2	<i>L-type Amino acid Transporter 1, 2</i>
lncARN	ARN long non codant
M-GAPP	<i>modified-GAPP</i>
MAML3	<i>Mastermind-like transcriptional coactivator 3</i>
MAO	MonoAmine Oxydase
MAX	<i>Myc-Associated factor X</i>
MDH2	Malate DéHydrogénase 2
MEK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase, MAP2K</i>
MERTK	<i>MER proto-oncogene TyrosineKinase</i>
métyrosine	alpha-méthyl-L-Tyrosine
MFBG	MétaFluoroBenzylGuanidine
miARN	microARN
MIBG	MétaIodoBenzylGuanidine
MID	MIDdle
miRISC	<i>microRNA RNA-induced silencing complexe</i>
mTORC1	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
Mtpn	Myotrophine
Munc13	<i>Mammalian UNCoordinated-13</i>
Munc18	<i>Mammalian UNCoordinated-18</i>
ncARN	ARN non codant

NEM2	Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 2
NET	<i>NorEpinephrine Transporter</i>
NF1	<i>NeuroFibromin 1</i>
NGFR	<i>Nerve Growth Factor Receptor</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
Nka	Neurokinine A
Nluc	Nano-luciférase
Noc2	<i>Nucleolar complex protein 2</i>
NPY	Neuropeptide Y
Nsf	<i>N-ethylmaleimide sensitive factor</i>
nt	nucléotides
Onecut2	<i>One cut homeobox 2</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
p70S6K	<i>p70S6 kinase</i>
PA	<i>Phosphatidic Acid</i>
Pabpc	<i>Poly(A)-binding protein cytoplasmic</i>
PACAP	<i>Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide</i>
PASS	<i>Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score</i>
Pat11	<i>Poly(A) tail length regulator 1</i>
PAZ	Piwi-Ago-Zwille
pb	<i>paires de base</i>
PC	PhosphatidylCholine
PCC	PhéoChromoCytome
Pclo	Piccolo
PGL	ParaganGLiome
PHD	<i>ProlylHydroxylase Domain protein</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PIWI	<i>P-element Induced WImpy testis</i>
PN	Patient Normotendus
PNMT	Phényléthanolamine N-MéthylTransférase
pol II	polymérase II
PPGL	paragangliome et phéochromocytome
PPRT	<i>Peptide Receptor Radionuclide Therapy</i>
pré-miARN	précurseur-miARN
Pst	Pancréastatine
Ran-GTP	<i>Ran-Guanosine TriPhosphatase</i>
RCPG	Récepteurs Couplés aux Protéines G
RE	Réticulum Endoplasmique
RE-1	<i>Repressor Element 1</i>
REST	<i>RE-1 Silencing Transcription factor</i>
RET	<i>REarranged during Transfection</i>
Rim	<i>Rab3-Interacting Molecule</i>
Rimbp	<i>Rim binding protein</i>
RPH3A	RabPHiline 3A
RUSH	<i>Retention Using Selective Hooks</i>
SDH	<i>Succinate DesHydrogenase complex iron sulfur</i>
SDHB	<i>Succinate DesHydrogenase complex iron sulfur subunit B</i>
SgII à IV	Sécréto granines II à IV
Sgta	<i>Small glutamine rich tetratricopeptide repeat</i>

SHR	<i>spontaneously hypertensive rat</i>
SLC25A11	<i>solute carrier family 25 member 11</i>
SLC6A2	<i>solute carrier family 6 member 2</i>
SLC7A1	<i>solute carrier family 7 member 1</i>
Snap	<i>Soluble nsf attachment protein</i>
Snap25	<i>Synaptosomal-associated protein 25</i>
SNARE	<i>Soluble Nsf Attachment protein REceptors</i>
snoARN	<i>small nucleolar RNA</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphisme</i>
SST	<i>somatostatin</i>
SSTR	<i>somatostatin receptor</i>
Stx1	<i>syntaxine 1</i>
Stx6	<i>syntaxine 6</i>
Stxbp1	<i>Syntaxine binding protein 1</i>
SUCLG2	<i>SUccinate-CoA Ligase GDP-forming subunit 2</i>
Sv2	<i>Synaptic vesicle glycoprotein 2</i>
Syp	<i>synaptophysine</i>
Syt1	<i>synaptotagmine 1</i>
Syt4	<i>synaptotagmine 4</i>
Syt14	<i>Synaptotagmine like 4</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TEM	<i>Transition Épithélio-Mésenchymateuse</i>
TEP	<i>Tomographie par Émission de Positons</i>
TET	<i>Ten-Eleven Translocation</i>
TGN	<i>Trans Golgi Network</i>
TH	<i>Tyrosine Hydroxylase</i>
TIRF	<i>Total Internal Reflection Fluorescence</i>
TK	<i>Tyrosine Kinase</i>
TMEM127	<i>protéine transmembranaire 127</i>
TNE	<i>Tumeurs NeuroEndocrines</i>
Tnrc6	<i>TriNucleotide Repeat Containing adaptor 6</i>
Trbp	<i>TAR RNA-binding protein</i>
TSC2	<i>Tuberous sclerosis complex 2</i>
UTR	<i>UnTranslated Region</i>
V-ATPase	<i>Vacuolar-ATPase</i>
Vamp2	<i>Vesicle-associated membrane protein 2</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHL	<i>Von Hippel-Lindau</i>
VMA	<i>VanillylMandelic Acid</i>
VMAT	<i>Vesicular MonoAmine Transporter</i>
VS	<i>Vésicules Synaptiques</i>
Wnt	<i>Wingless integration site</i>
Xpo1	<i>exportine 1</i>
Xpo5	<i>exportine 5</i>
Xrn1	<i>exoribonucléase 1</i>

## Table des illustrations

Figure 1 Système neuroendocrinien et localisation des cellules neuroendocrines _____	20
Figure 2 Principales hormones et neuropeptides sécrétés par l'axe hypothalamo-hypophysaire _____	22
Figure 3 Activation de l'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien par le stress et le rétrocontrôle négatif _____	24
Figure 4 Voie de biosynthèse des catécholamines _____	25
Figure 5 Catabolisme des catécholamines par les enzymes COMT et MAO _____	27
Figure 6 Localisation des glandes surrénales et organisation histologique des deux unités fonctionnelles _____	28
Figure 7 Régulation de la sécrétion surrénalienne de catécholamines par le nerf splanchnique _____	30
Figure 8 Modèle moléculaire d'une vésicule synaptique moyenne et sa composition _____	31
Figure 9 Deux voies distinctes de sécrétion sont présentes dans les cellules neuroendocrines _____	33
Figure 10 Rôle des lipides et des granines dans la biogenèse des vésicules de sécrétion au niveau du réseau trans golgi _____	34
Figure 11 Formation et maturation des granules de sécrétion dans les cellules neuroendocrines _____	36
Figure 12 Principales étapes de l'exocytose _____	41
Figure 13 Couplage exocytose-endocytose dans les cellules neuroendocrines _____	42
Figure 14 Localisation des phéochromocytomes et des paragangliomes _____	45
Figure 15 Stratégie personnalisée basée sur la classification moléculaire pour les patients atteints de PPGL _____	58
Figure 16 Transcription et caractéristiques structurales du pri-miARN _____	65
Figure 17 Biogenèse et fonction des miARN canoniques _____	66
Figure 18 Sites cibles des miARN _____	70
Figure 19 Mécanismes de la répression médiée par les miARN _____	72
Figure 20 Identification d'un ensemble de miARN impliqués dans la régulation de la sécrétion d'insuline dans les cellules $\beta$ -pancréatiques _____	80
Figure 21 Cellule PC12 transfectée avec le rapporteur rouge VAMP2-pHmScarlet _____	96
Figure 22 Schéma des différentes boucles de régulations possibles entre un miARN et un facteur de transcription (A) et entre un miARN, un facteur de transcription et une cible commune (B) _____	100

Plusieurs illustrations ont été dessinées à l'aide de BioRender.

## Liste des tableaux

Tableau 1 Caractéristiques des récepteurs adrénergiques _____	26
Tableau 2 Symptômes des patients atteints de phéochromocytome _____	46
Tableau 3 Gènes et maladies associées au PPGL _____	53
Tableau 4 Répartition des mutations drivers identifiées dans les échantillons des GSE19422 et GSE29742 _____	93

# Introduction

## 1. Physiologie du système neuroendocrinien

### 1.1. Milieu intérieur et homéostasie

« L'organisme vivant n'est qu'une machine admirable douée des propriétés les plus merveilleuses et mise en activité à l'aide des mécanismes les plus complexes et les plus délicats. Il n'y a pas des forces en opposition et en lutte les unes avec les autres ; dans la nature il ne saurait y avoir qu'arrangement et dérangement, qu'harmonie et désharmonie. » (Bernard, 1865)

Claude Bernard, en 1865, développe la notion de milieu intérieur, véritable produit de l'organisme, qui conserve des rapports nécessaires d'échanges et d'équilibre avec le milieu extérieur, l'environnement qui l'entoure. Ainsi, l'organisme opère des modifications continues compensatoires des fonctions corporelles afin de s'adapter aux perturbations intérieures et extérieures, lui permettant d'acquérir une vie libre et indépendante.

Ce concept est étendu par Walter B. Cannon sous le nom d'homéostasie, un état d'équilibre « stasis », pouvant varier mais relativement constant « omoios », des caractères physico-chimiques de l'organisme impliquant le cerveau et les nerfs, le cœur, les poumons, les reins et la rate, travaillant tous en coordination (Cannon, 1929).

### 1.2. Le système neuroendocrinien, acteur de l'homéostasie

#### 1.2.1. Introduction

Chez les métazoaires, les informations provenant de l'environnement sont notamment collectées et traitées par le système nerveux. Les cellules neuronales qui le composent communiquent au travers d'impulsions électriques afin de répondre spécifiquement et instantanément à ces stimuli notamment via le contrôle des muscles squelettiques, cardiaques et lisses. Cette coordination est également régie par le système endocrinien à l'origine de la synthèse et la sécrétion de substances biochimiques dans la circulation sanguine régulant ainsi des fonctions essentielles de l'organisme : le métabolisme, la croissance et le développement, la reproduction ou encore la réponse au stress. Ces deux systèmes agissent en synergie, communiquant entre eux afin de maintenir l'homéostasie de l'organisme.

Le système neuroendocrinien est composé de cellules ayant la particularité de sécréter et libérer des hormones et neuropeptides dans la circulation sanguine en réponse à des signaux électriques



ou chimiques provenant du système nerveux. Intermédiaire des systèmes nerveux et endocrinien, il s'organise en un réseau complexe de cellules au sein du système nerveux central avec l'hypothalamus et l'hypophyse ou organisées sous forme d'organes et de glandes telles que la thyroïde, les parathyroïdes ou encore les surrénales au niveau périphérique (Figure 1). Des cellules neuroendocrines isolées sont également retrouvées dispersées au sein du tube digestif, des îlots pancréatiques, des poumons, des voies respiratoires de la tête et du cou, des testicules et des ovaires.

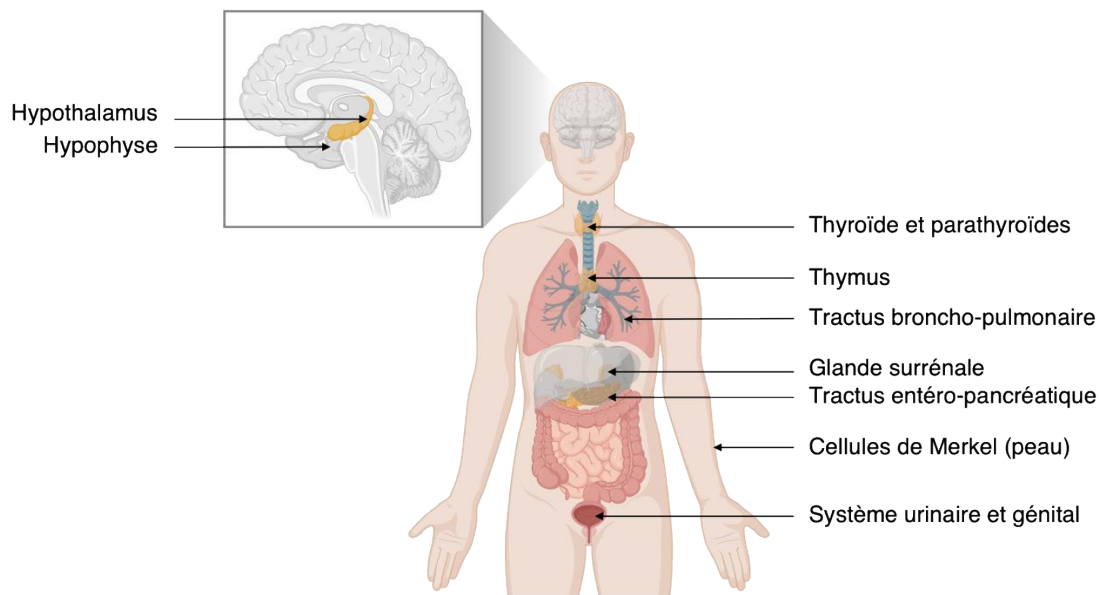


Figure 1 Système neuroendocrinien et localisation des cellules neuroendocrines

### 1.2.2. Cellules neuroendocrines

Les cellules neuroendocrines présentent des similitudes morphologiques et fonctionnelles avec les neurones et les cellules dérivant de la crête neurale (Tischler, 1989). Regroupées sous le terme de cellules « *amine precursor uptake and decarboxylation* » (APUD), elles possèdent ou ont possédé la faculté de décarboxylation d'acides aminés à certains stades de leur développement et dans certains cas pour une période de quelques jours seulement (A. G. Pearse, 1969; A. G. E. Pearse, 1982). Leur origine embryonnaire, initialement décrite comme commune, a fait l'objet de nombreux débats (Fontaine & Le Douarin, 1977; Ronald E. Stevens & Moore, 1983). Le dogme initial reposait sur une origine embryonnaire ectodermique pour l'ensemble des APUD. Ainsi, elles dériveraient de cellules provenant de la crête neurale, une population de cellules multipotentes en migration, présentes de façon transitoire au cours de l'embryogenèse chez les vertébrés (Takahashi et al., 2013). Néanmoins, une série d'études expérimentales a démontré l'origine endodermique des cellules neuroendocrines pancréatiques,

intestinales et pulmonaires (Andrew & Kramer, 1979; Pictet et al., 1976). De plus, l'origine ectodermique des cellules chromaffines surrenaliennes et extra-surrenalienne ainsi que des cellules C thyroïdiennes a également été confirmée (M. S. Adams & Bronner-Fraser, 2009).

Jusqu'à très récemment, il était admis que les cellules chromaffines partagent un progéniteur commun avec les neuroblastes sympathiques. Toutefois, de nouvelles études chez l'être humain et la souris ont montré une ségrégation plus précoce de ces deux lignées (Hanemaaijer et al., 2021). Les cellules chromaffines dérivent ainsi de cellules pluripotentes de la crête neurale appelées précurseurs des cellules de Schwann. D'ailleurs, l'ablation du nerf préganglionnaire, sur lequel migrent ces cellules, entraîne un déficit marqué en cellules chromaffines (Furlan et al., 2017).

Finalement, à la suite d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), les progéniteurs des cellules neuroendocrines migrent vers leurs emplacements cibles tout en acquérant, sous l'influence du milieu environnant, leur phénotype sécrétoire hormonal. Ainsi, en réponse à une stimulation électrique ou chimique, elles sécrètent des hormones et autres produits de régulation dans la circulation sanguine via un processus de sécrétion dite régulée. La plupart de ces hormones sont des polypeptides produits par clivage protéolytique à partir de précurseurs plus grands appelés prohormones. Ces « agents de communication » sont encapsulés dans des granules de sécrétion dont la taille varie considérablement en fonction du type cellulaire, pouvant aller de 100 à 1000 nm. À la suite d'un influx calcique, ces hormones sont libérées dans le milieu extracellulaire via la fusion du granule à la membrane plasmique. La nature des hormones sécrétées va différer entraînant des effets distincts sur l'organisme.

### 1.3. Régulation des processus biologiques par le système neuroendocrinien

L'hypothalamus, lui-même sous l'influence de neurotransmetteurs et peptides régulateurs, détecte les sécrétions humorales des tissus cibles et sécrète, en conséquence, des hormones régulatrices vers le lobe antérieur de l'hypophyse (Figure 2). Bien qu'elle représente moins de 2% du volume total du cerveau, cette « glande maîtresse » du système neuroendocrinien couvre, de manière sophistiquée et complexe, de nombreuses fonctions de régulation des fonctions biologiques. Elle est constituée d'une population hétérogène de cellules neuroendocrines à l'origine de sécrétions hormonales et donc d'effets régulateurs, spécifiques à l'organe ciblé.

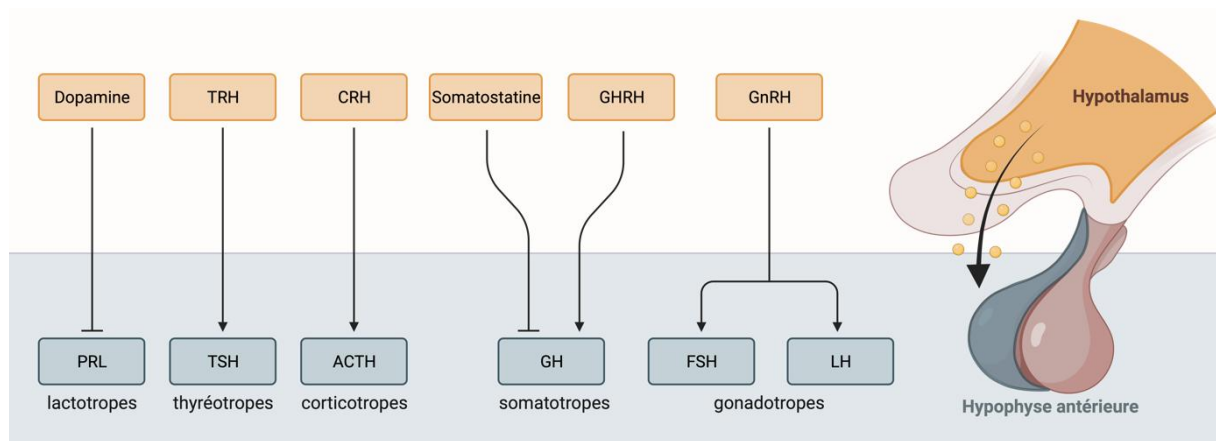


Figure 2 Principales hormones et neuropeptides sécrétés par l'axe hypothalamo-hypophysaire

Par exemple, la sécrétion de la corticolibérine (*corticotropin-releasing hormone*, CRH) par le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus dans le système porte, stimule la sécrétion de l'hormone adrénocorticotrope (*adreno corticotropic hormone*, ACTH) par les cellules corticotropes de l'hypophyse. Cette hormone, libérée dans la circulation sanguine, agit sur la synthèse et la sécrétion de glucocorticoïdes par le cortex des glandes surrénales. Les glucocorticoïdes, dont le cortisol, sont des hormones stéroïdiennes impliquées dans le métabolisme et la redistribution de l'énergie. Cette régulation est requise pour maintenir l'homéostasie lorsque l'organisme est confronté à un stress physiologique mais également en réponse à des changements diurnes normaux du métabolisme (Oakley & Cidlowski, 2013). Le cortisol est notamment responsable d'une impulsion métabolique, de manière circadienne lors du réveil mais également lors des périodes d'épuisement énergétique quotidien via une mobilisation du glucose et la stimulation de l'appétit.

Ainsi, le système neuroendocrinien, principalement via l'axe hypothalamo-hypophysaire mais également par le biais de cellules APUD isolées, ajuste la production d'hormones et maintient un équilibre optimal du *milieu interne*, approprié à une fonction normale de l'organisme.

## 1.4. « Fight or flight » et système sympatho-surrénalien

### 1.4.1. « Fight or flight »

Le système neuroendocrinien est également à l'origine de réponses spécifiques aux différentes perturbations de l'homéostasie. Parmi celles-ci, l'exposition au froid, l'hémorragie hypotensive, l'hypoglycémie induite, la douleur traumatique ou encore la détresse émotionnelle vont engendrer chez l'organisme une réponse dite « fight or flight » à l'origine d'ajustements compensatoires et anticipatifs de processus physiologiques et comportementaux (Cannon & de

la Paz, 1911). Confronté à un facteur de stress aigu, l'organisme réagit à la menace via l'activation du système nerveux sympathique. Soit il se bat et l'emporte, soit il accepte la défaite pour l'éviter et fuir, si sa survie en dépend (Cannon, 1915). La dynamique de la réponse au stress varie donc selon le caractère, l'intensité, la durée, l'état de santé ou encore le contexte (Berger et al., 2019). En effet, l'expérience de la détresse dépend de la perception du stress interne et externe par l'organisme et de sa capacité perçue à y faire face.

Ainsi, l'interprétation du stimulus opérée par le système limbique menant à une réponse de « fight or flight » de l'organisme s'observe via une libération massive « d'hormones de stress » à l'origine de l'émergence d'un modèle ajusté de distribution de l'énergie de l'organisme. Parmi ces adaptations physiologiques, on observe une augmentation de l'apport en oxygène dans le sang via des modulations aux niveaux cardiaque, bronchique et musculaire. Cela s'accompagne également d'une augmentation de l'apport en substrats énergétiques suffisants, notamment via la mobilisation du glucose à partir du foie, pour assurer une activité musculaire accrue ainsi qu'une prolongation de la mydriase pour améliorer l'acuité visuelle. Une relaxation des muscles lisses des tissus non nécessaires, au niveau du tractus intestinal, des reins ou encore de l'utérus, est également observée. Cela s'ajoute à une vasoconstriction des vaisseaux de la peau et du tractus gastro-intestinal.

#### 1.4.2. Axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien

Les glucocorticoïdes, impliqués dans le métabolisme et la redistribution de l'énergie, sont également mobilisés lors d'épisodes de stress via l'activation de la voie hypothalamo-hypophysio-surrénalienne (Figure 3) (Herman, 2022; Mesiano & Jaffe, 1997). Le récepteur des glucocorticoïdes, de la superfamille des récepteurs nucléaires, est exprimé dans la plupart des organes et tissus. Ainsi, de nombreuses études dont celle réalisée par Sapolsky et collaborateurs, répertorient l'effet de ces hormones dans de nombreux systèmes physiologiques (Sapolsky et al., 2000). Leur large spectre d'action permet à ces hormones de coordonner les composants centraux et périphériques de l'organisme afin de faciliter les réponses comportementales appropriées au stress et générer des réponses adaptatives par l'intermédiaire du métabolisme, l'alimentation, l'immunité et la reproduction. De plus, dans une boucle de rétroaction classique, les glucocorticoïdes ciblent également l'hypothalamus et l'hypophyse afin d'inhiber la production et la libération de CRH et d'ACTH (Keller-Wood & Dallman, 1984; Oakley & Cidlowski, 2013).

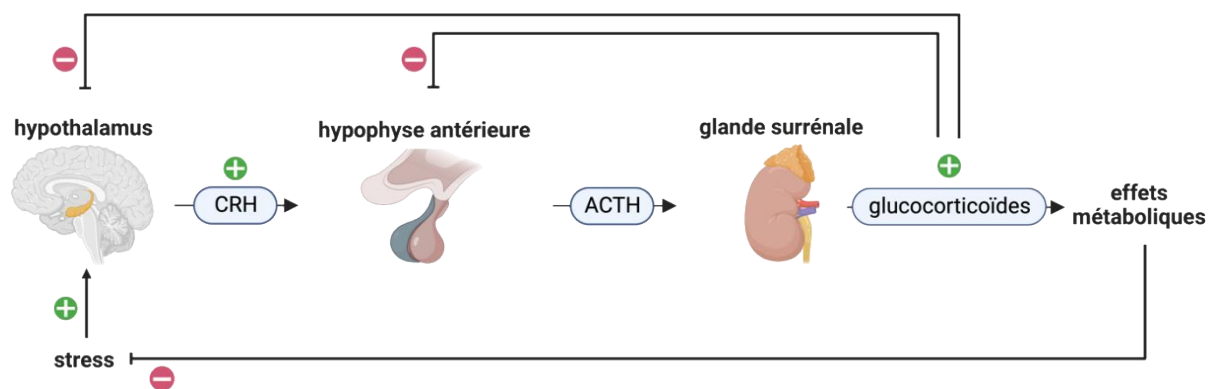


Figure 3 Activation de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien par le stress et le rétrocontrôle négatif

### 1.4.3. Catécholamines, unité fonctionnelle du système sympatho-surrénalien

Ces réponses rapides de l'organisme sont également et principalement médiées par les catécholamines, un terme regroupant la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline, qui sont synthétisés principalement par la glande médullosurrénale. En condition de repos chez l'être humain, les taux plasmatiques des catécholamines varient généralement de 25 à 70 pg/mL (0,2-0,5 nmol/L) pour la dopamine, 200 à 300 pg/mL (1-1,5 nmol/L) pour la noradrénaline et 30 à 70 pg/mL (0,2-0,5 nmol/L) pour l'adrénaline (William Tank & Lee Wong, 2014). En réponse à un stress, l'activation du système sympathique est corrélée à l'augmentation de 2 à 60 fois des taux plasmatiques d'adrénaline et de noradrénaline (Lymperopoulos et al., 2016). Par exemple, un seul épisode de stress par immobilisation peut entraîner une diminution d'environ 30% des niveaux d'adrénaline surrénalienne stockée chez le rat. Ces niveaux reviennent aux taux de base après trois semaines d'immobilisation quotidienne répétée suggérant l'existence d'une compensation par l'organisme (Kvetňanský & Mikulaj, 1970).

#### 1.4.3.1. Biosynthèse des catécholamines

Les catécholamines, de la classe des monoamines, sont les principaux médiateurs de la réponse de l'organisme aux facteurs de stress. Ces composés hydrosolubles sont synthétisés à partir de la tyrosine, un acide aminé non essentiel pouvant provenir de l'alimentation ou par hydroxylation de la phénylalanine, principalement dans le foie, les reins et le pancréas (Garibotto et al., 2002; Lehnert, 1998). La L-tyrosine, captée par la cellule chromaffine via un transport actif impliquant les transporteurs 1 et 2 d'acides aminés de type L (*L-type amino acid transporter*, LAT1, LAT2), est convertie en L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) par la tyrosine hydroxylase (TH) (Figure 4). La L-DOPA est décarboxylée par la L-DOPA décarboxylase (*aromatic amino acid decarboxylase*, AADC) pour produire la dopamine. La

dopamine, transloquée par des transporteurs vésiculaires de monoamines (*vesicular monoamine transporter*, VMAT) au sein des granules de sécrétion, est convertie en noradrénaline par la dopamine β-hydroxylase (DBH) qui est majoritairement liée à la membrane interne des granules (Eisenhofer et al., 2001). Finalement, dans les cellules chromaffines et les neurones adrénergiques, la noradrénaline peut être métabolisée en adrénaline par la phényléthanolamine N-méthyltransférase (PNMT).

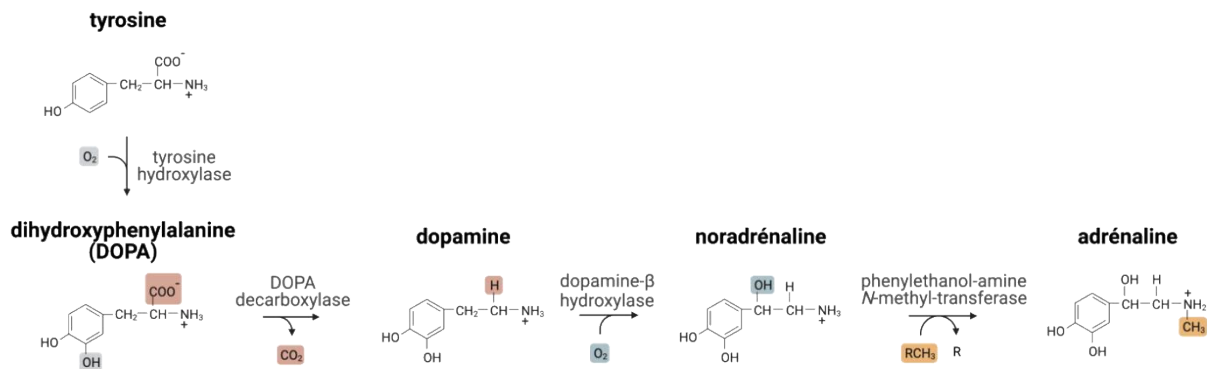


Figure 4 Voie de biosynthèse des catécholamines

La TH est l'enzyme limitante de la synthèse des catécholamines (Zigmond et al., 1989). D'ailleurs, la perturbation du gène de la TH est létale, la perte des catécholamines entraînant une altération de la fonction cardiaque (Kobayashi et al., 1995). Particulièrement activée au niveau transcriptionnel par plusieurs voies dépendantes de l'AMPc à la suite de la stimulation de la médullosurrénale par le nerf splanchnique, elle permet, en réponse à la libération accrue des catécholamines, de maintenir leur teneur dans les cellules chromaffines (Lehnert, 1998). En outre, la sécrétion accrue en glucocorticoïdes influence également la synthèse des catécholamines via l'augmentation de son activité enzymatique (Ehrhart-Bornstein et al., 1998). De plus, à court et long termes, un rétrocontrôle négatif de l'expression de la TH est exercé par les catécholamines sécrétées (Daubner et al., 2011). En réponse à divers facteurs de stress, la libération massive de catécholamines est également compensée par une activité accrue de la DBH et la PNMT. Cette réponse est particulièrement rapide pour la PNMT où un seul épisode de stress par immobilisation est nécessaire pour élever les niveaux d'ARNm à leur maximum permettant ainsi d'augmenter l'expression de la protéine d'environ 50% (Kvetňanský & Mikulaj, 1970; Nankova et al., 1994). Par ailleurs, de nombreuses études ont mis en évidence l'influence des glucocorticoïdes dans la régulation de cette activité (Viskupic et al., 2002). Ont notamment été démontrés, la présence intracytoplasmique du récepteur aux glucocorticoïdes et

d'éléments de réponse aux glucocorticoïdes au sein de la région promotrice du gène de la PNMT (Ceccatelli et al., 1989; Zuckerman-Levin et al., 2001).

#### 1.4.3.2. Tissus cibles des catécholamines

Les catécholamines libérées massivement dans la circulation sanguine interagissent avec les récepteurs adrénergiques, des récepteurs aminergiques couplés aux protéines G (RCPG), présents sur les membranes cellulaires des tissus cibles. Cela entraîne l'activation de voies de signalisation et la modification conséquente de la fonction des organes. Pourtant, toutes les catécholamines ne sont pas égales dans leur capacité à activer les différents récepteurs adrénergiques. Leurs effets dépendent de la distribution, du type et de l'activité physiologique des cinq récepteurs connus ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) (Tableau 1).

*Tableau 1 Caractéristiques des récepteurs adrénergiques  
D'après (Sharma & M. Flood, 2019).*

Type de récepteur	Distribution tissulaire	Puissance agoniste	Effets physiologiques
$\alpha_1$	muscle lisse, yeux	adrénaline $\geq$ noradrénaline	contraction du muscle lisse, gluconéogenèse, vasoconstriction dilatation de la pupille, mydriase
$\alpha_2$	pancréas, plaquettes, épithélium ciliaire, glande salivaire	adrénaline $\geq$ noradrénaline	$\searrow$ libération de neurotransmetteurs $\nearrow$ sécrétion de glucagon
$\beta_1$	cœur, rein	adrénaline $\geq$ noradrénaline	$\nearrow$ fréquence cardiaque $\nearrow$ sécrétion de rénine
$\beta_2$	muscle lisse, bronchioles, foie, muscle squelettique	adrénaline $\gg$ noradrénaline	vasodilatation, bronchodilatation, $\searrow$ sécrétion d'insuline
$\beta_3$	tissu adipeux	noradrénaline $>$ adrénaline	$\nearrow$ lipolyse et libération d'acides gras

Ainsi, une sécrétion sélective d'adrénaline ou de noradrénaline peut survenir en réaction à des facteurs de stress particuliers. Ainsi, l'adrénaline a des effets vasculaires et métaboliques plus puissants que ceux de la noradrénaline (Ahlquist, 1948; Hjemdahl et al., 1979). Par exemple, en réponse à une hypoglycémie induite par l'insuline ou un exercice physique, une sécrétion préférentielle d'adrénaline se produira en raison de sa plus grande capacité à mobiliser le glucose à partir du foie. Cela contraste avec la libération préférentielle de noradrénaline observée lors d'une exposition au froid, détectée par des récepteurs sympathiques thermosensibles. Ces récepteurs adrénergiques sont aussi la cible de certains médicaments. En effet, les agonistes et antagonistes de ces derniers sont notamment utilisés pour traiter l'insuffisance cardiaque, les arythmies cardiaques ou encore l'hypertension ou l'hypotension.

Ainsi, cette spécificité de réponse aux signaux de stress permet à l'organisme de s'adapter à son environnement.

### 1.4.3.3. Catabolisme des catécholamines

Une fois sécrétées, la demi-vie des catécholamines dans la circulation sanguine n'est que de quelques minutes (Peaston & Weinkove, 2004). En effet, elles sont rapidement catabolisées en dérivés inactifs par la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) et les monoamines oxydases A et B (MAO). Par exemple, la noradrénaline et l'adrénaline sont catabolisées par la COMT en normétanéphrine et métanéphrine respectivement (Figure 5). Une oxydation de ces métabolites réalisée par MAO est à l'origine de la formation d'acide vanylmandélique (*vanillylmandelic acid*, VMA). Ils sont finalement éliminés par les reins, retrouvés dans les urines sous forme libre ou conjuguée avec des dérivés O-méthyl, des groupements sulfates ou encore avec l'acide glucuronique.

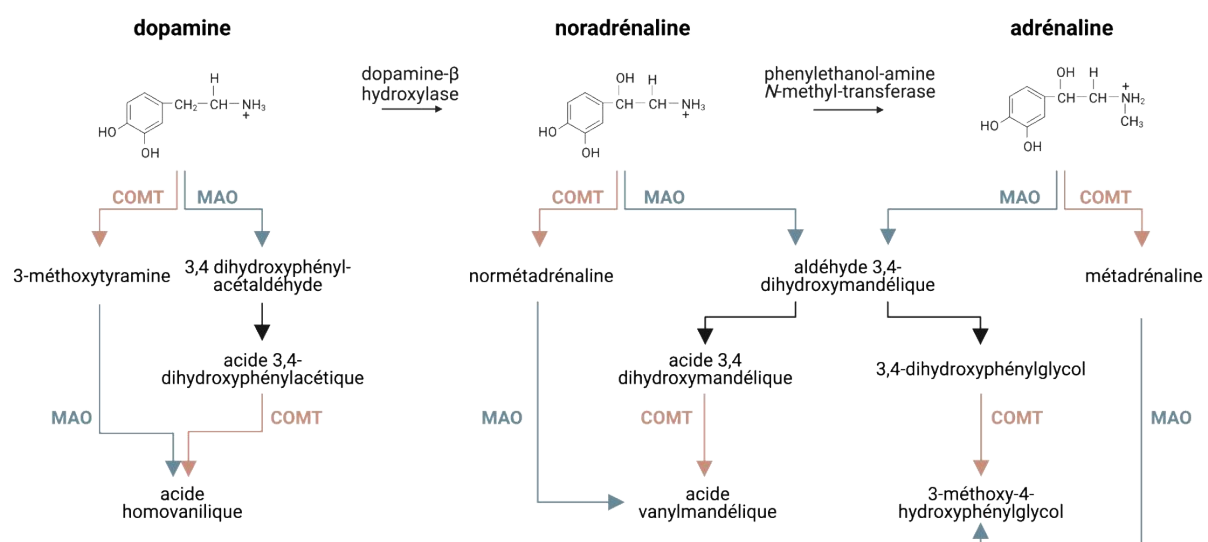


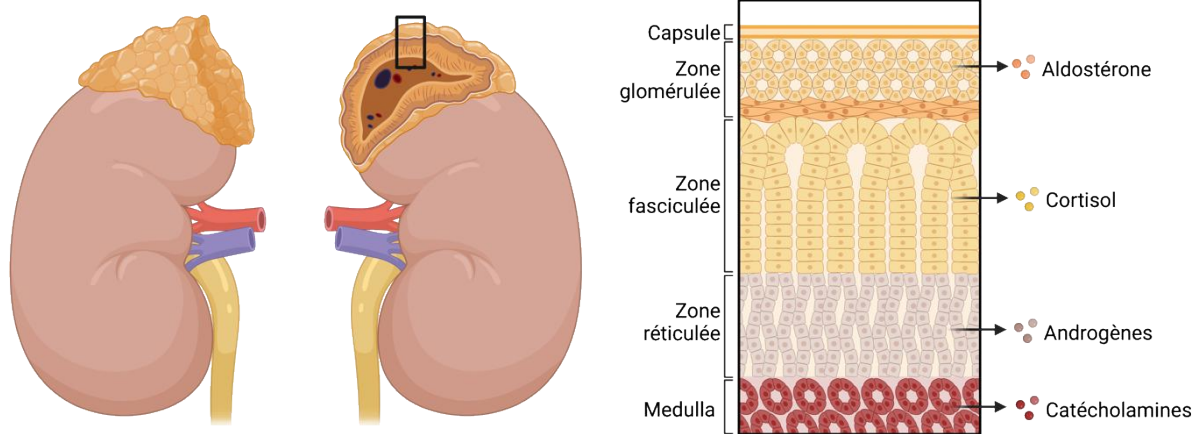
Figure 5 Catabolisme des catécholamines par les enzymes COMT et MAO (COMT : catéchol-O-méthyltransférase, MAO : monoamines oxydases A et B)

### 1.4.4. La glande surrénale, protagoniste essentiel du maintien de l'homéostasie

Situées au-dessus des reins comme le désigne leur nom, les glandes surrénales sont des protagonistes essentiels au maintien de l'homéostasie. D'une taille variant de 3 à 4 cm pour un poids de 5 à 7 g en moyenne, la glande surrénale droite a une forme pyramidale alors que la gauche, légèrement plus petite, a une forme de goutte (Figure 6) (Lam et al., 2001; Mesiano & Jaffe, 1997; Schneller et al., 2014). Les glandes sont entourées d'une capsule fibreuse ferme composée de cellules stromales, de fibroblastes et de myofibroblastes. Alimentées par des branches artérielles provenant de l'artère phrénique inférieure, de l'aorte abdominale et des



artères rénales, elles ont l'un des taux d'apport sanguin par gramme de tissu les plus élevés de tous les organes (Sapirstein & Goldman, 1958). Par exemple, chez le rat, la surrénale représente environ 0,02% du poids corporel total mais reçoit environ 0,14% du débit cardiaque.



*Figure 6 Localisation des glandes surrénales et organisation histologique des deux unités fonctionnelles*

La surrénale est composée de deux structures anatomiques, histologiques, physiologiques, et fonctionnelles distinctes. Le cortex, d'origine mésodermique, est composé d'une zone externe glomérulée, d'une zone intermédiaire fasciculée et d'une zone interne réticulée (Carballeira & Fishman, 1980) (Figure 6). De couleur jaunâtre du fait leurs compositions lipidiques, ces trois régions distinctes du cortex sont respectivement le lieu de synthèse de minéralocorticoïdes, de glucocorticoïdes, et d'hormones androgènes (Kemp, 1937; Miller & Auchus, 2011). La médullosurrénale, d'origine ectoblastique, est retrouvée au centre de la glande surrénale et constitue environ 10% de celle-ci. Brune rougeâtre car fortement irriguée, elle est responsable de la grande majorité (>90%) des taux de catécholamines synthétisés dans l'organisme (Eisenhofer et al., 1995; Kemp, 1937). Les cellules progénitrices sympathosurréaliennes donnent également naissance aux cellules chromaffines du paraganglia, dispersées au sein de l'organisme et jouant également un rôle essentiel dans le contrôle de l'homéostasie via la libération de neurotransmetteurs dont la dopamine et la noradrénaline (Berger et al., 2019; Scriba et al., 2020).

Chez l'adulte, il existe deux populations de cellules chromaffines médullo-surréaliennes qui se distinguent par la présence ou non de la PNMT, l'enzyme de conversion de la noradrénaline en adrénaline. Les cellules chromaffines adrénérgiques exprimant la PNMT étant majoritaires, l'adrénaline représente environ 75-80% des catécholamines synthétisées par la surrénale (Dhara et al., 2018). D'ailleurs, l'expression extra-surrénalienne de la PNMT étant limitée à un faible nombre de neurones du système nerveux central et à un ensemble de cardiomyocytes, la glande

surrénale est la source majoritaire d'adrénaline de l'organisme (>95%) (Kennedy et al., 1995; Osuala et al., 2011). Les sécrétions noradrénergiques de la glande chromaffine ne contribuent que faiblement à la proportion de noradrénaline totale produite par l'organisme (<10%) majoritairement produite par le tronc cérébral et le système sympathique.

La localisation des cellules chromaffines dans la médullosurrénale dépend de leur phénotype et peut varier en fonction des espèces. Dans la médullosurrénale bovine, les cellules adrénérgiques sont majoritairement situées en périphérie de la médulla suggérant que les cellules PNMT positives sont la cible des glucocorticoïdes sécrétés par le cortex, accentuant leur potentiel régulateur (Aunis, 1998; Livett et al., 1982). Ces interactions étroites entre le cortex et la médulla ont été identifiées dès l'organogenèse surrénalienne affectant de façon majeure la différenciation, la morphogenèse et la survie de cet organe (M. Haase et al., 2011; Schinner & Bornstein, 2005). La communication entre ces structures, demeurant majeure à l'âge adulte, est facilitée par le flux sanguin artériel centripète (Bornstein et al., 1994; Murakami et al., 1989). De surcroît, des cellules corticales sont présentes de manière diffuse dans la médullosurrénale et inversement. Ainsi, dans la médullosurrénale, la sécrétion de catécholamines et de stéroïdes est régulée par un réseau complexe d'interactions autocrines, paracrines et endocrines (Lefebvre et al., 2016).

#### 1.4.5. Stimulation de la médulla et sécrétion de catécholamines

Lors d'un stress, l'innervation cholinergique de la médullosurrénale par le nerf splanchnique est le stimulateur prédominant de la libération de catécholamines dans la circulation sanguine (Figure 7) (Mravec, 2005). Ainsi, une seule cellule chromaffine peut bénéficier d'une stimulation par cinq synapses (Colomer et al., 2009). C'est la nature du stress rencontré qui va déterminer la sous-population de cellules chromaffines mobilisées. Leurs terminaisons nerveuses étant morphologiquement différentes, la régulation de leur sécrétion passe par des voies neuronales distinctes. Ainsi, l'acétylcholine libérée active les récepteurs cholinergiques nicotiques des cellules chromaffines qui permettent une entrée de sodium et de potassium extracellulaire et induisent une dépolarisation localisée (Sala et al., 2007) (Figure 7). Cette dépolarisation entraîne l'activation de canaux calciques voltage-dépendant ayant pour conséquence une entrée de calcium dans les cellules et finalement une exocytose calcium-dépendante de leur contenu granulaire dans le milieu extracellulaire. De façon intéressante, il a également été démontré que les glucocorticoïdes corticosurrénaux influencent cette sécrétion (Ehrhart-Bornstein & Bornstein, 2008). En absence de stress et également au travers du nerf splanchnique, une activité électrique basale est observée dans les cellules chromaffines, ce qui

est compatible avec la présence d'adrénaline dans la circulation sanguine (Lopez Ruiz et al., 2022). Cette activité basale est toutefois très limitée, de l'ordre de quelques nanogrammes de catécholamines par minute (Lympelopoulos et al., 2016).

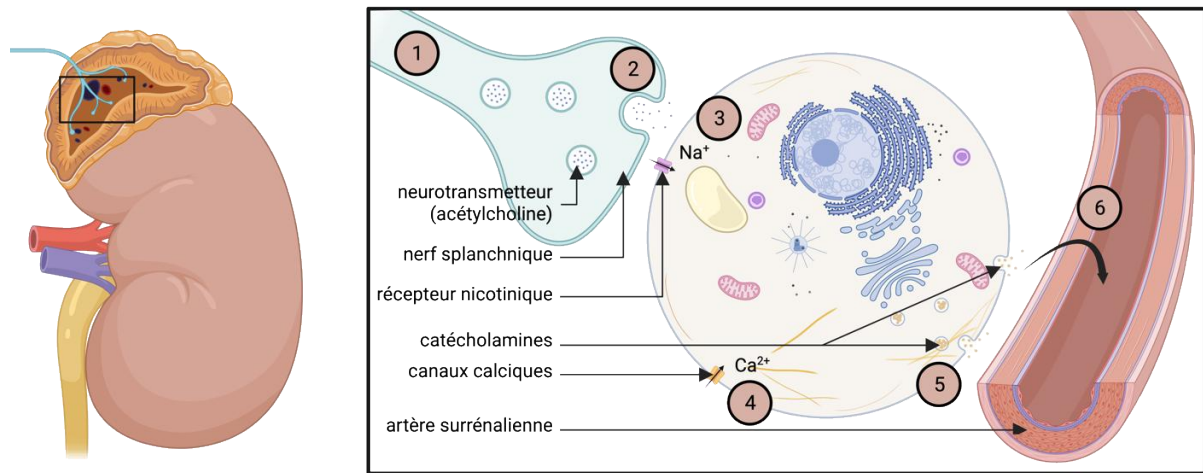


Figure 7 Régulation de la sécrétion surrénalienne de catécholamines par le nerf splanchnique

Les cellules chromaffines sont stimulées nerveusement par le nerf splanchnique (1) à la suite d'une libération d'acétylcholine (2) qui active les récepteurs nicotiniques (3). L'entrée d'ions sodium résultant provoque une dépolérisation de la cellule, l'activation des canaux calciques voltage-dépendants (4), l'entrée de calcium dans la cellule et déclenche l'exocytose. Ainsi, les membranes des granules de sécrétion fusionnent à la membrane plasmique (5) entraînant la libération des neuropeptides et hormones, dont les catécholamines, dans l'artère surrénalienne (6).

#### 1.4.6. Voie de la sécrétion régulée des cellules chromaffines

##### 1.4.6.1. Cellules chromaffines, modèle d'étude de la voie de la sécrétion régulée

La sécrétion calcium-dépendante des catécholamines s'inscrit dans un processus cellulaire correspondant à une biogenèse de vésicules de sécrétion contenant ces peptides bioactifs, leur transport et leur exocytose avec la membrane plasmique. Bien que cette voie soit commune à l'ensemble des cellules neuroendocrines, endocrines et celles du système nerveux, ce processus a été principalement étudié chez les cellules chromaffines bovines et tumorales de rat, les cellules de phéochromocytome PC12 (Greene & Tischler, 1976). En effet, ces cellules ont la particularité de contenir dans leur cytoplasme environ 22 000 granules de sécrétion par cellule, avec un diamètre moyen de 350 nm recouvrant environ 20% du volume cellulaire (Plattner et al., 1997; Yoo, 2010). Particulièrement étudiée de par la disponibilité du tissu et l'amélioration des protocoles d'isolement, des rendements importants de 2 à 3 mg correspondant à 10-15.10<sup>6</sup> cellules par glande surrénale bovine peuvent être obtenus (Birinci et al., 2020; Niedergang et al., 2021).

### 1.4.6.2. Les granules de sécrétion à cœur dense, unité du trafic membranaire

Les granules de sécrétion des cellules chromaffines présentent un aspect dense en microscopie électronique ce qui leur confère le nom de granules de sécrétion à cœur dense (GSCD). Cela est notamment lié à la composition lipidique et protéique de ces GSCD caractérisées par un contenu riche en catécholamines (0,8 à 1 M), calcium (40 mM), adénosine triphosphate (ATP) (150 à 300 mM), peptides et granines (Albillos et al., 1997; Montesinos et al., 2008; Winkler, 1997; Yoo, 2010).

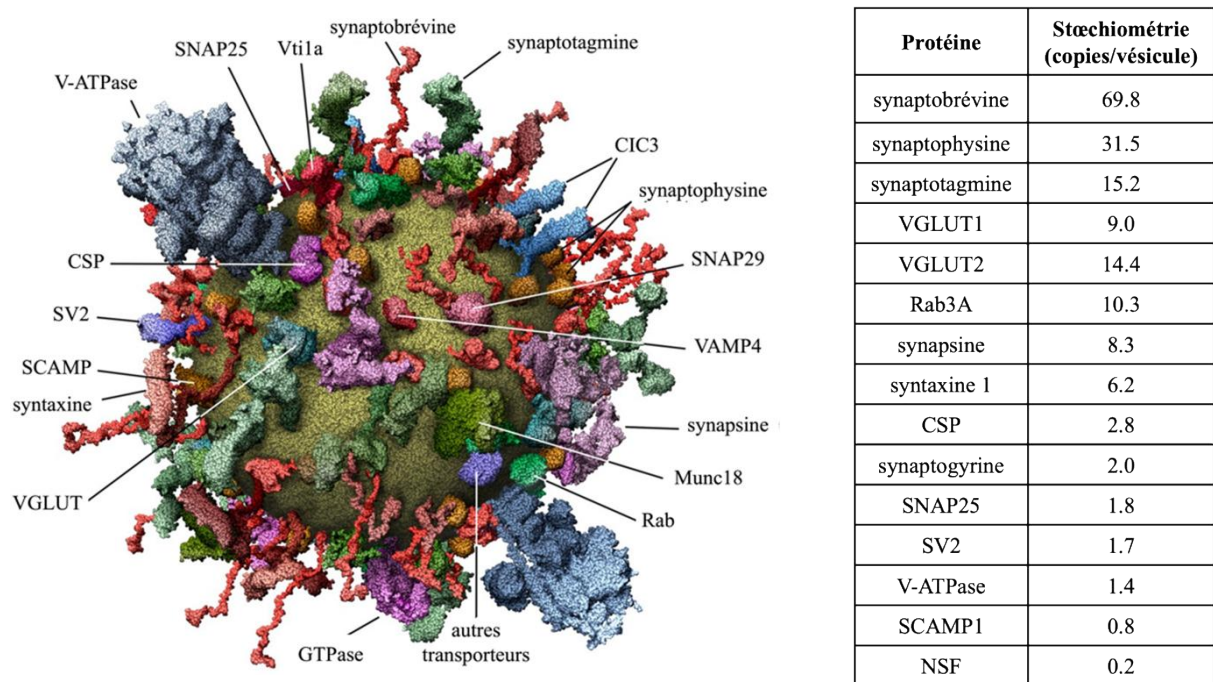


Figure 8 Modèle moléculaire d'une vésicule synaptique moyenne et sa composition  
D'après (Takamori et al., 2006).

En outre, des études protéomique par spectrométrie de masse ont permis l'identification de 686 protéines composant les GSCD de cellules chromaffines bovines (Wegrzyn et al., 2010). Réparties dans les fractions membranaire (384) et solubles (371), elles sont impliquées dans différentes catégories fonctionnelles permettant la production, le stockage, le transport ou encore la sécrétion des neuroeffecteurs bioactifs. Entre autres, des protéases, ATPases, enzymes impliquées dans la régulation de la réduction/oxydation ou encore le repliement des protéines et la régulation du calcium ont été identifiées. Cette étude corrobore les descriptions moléculaires et quantitatives des vésicules synaptiques (VS), utilisées comme modèle d'étude de la composition de cet organelle et considérées comme les unités minimales du trafic membranaire (Takamori et al., 2006). Des analyses approfondies par marquage immunocytochimique ont notamment permis de confirmer la présence de protéines communes

permettant de proposer un modèle simplifié de la composition des vésicules de sécrétion (Figure 8).

#### 1.4.6.3. Biosynthèse des hormones et neuropeptides et sécrétion

Le réticulum endoplasmique (RE), plus grand organite, en continuité avec la citerne périnucléaire, est le site majeur de biogenèse des composants membranaires, lipidiques et protéiques qui constituent la matrice des granules de sécrétion (Figure 9, 1A). Il joue également un rôle essentiel dans le métabolisme des glucides et le stockage du calcium.

A la suite de leur synthèse sous forme de précurseurs inactifs dans le cytosol, les hormones peptidiques et neuropeptides sont reconnus au travers d'un peptide signal situé à leur extrémité N-terminale par des particules de reconnaissance du signal (Keenan et al., 2001). Ces particules catalysent, avec leurs récepteurs associés à la membrane, le ciblage des protéines sécrétoires et membranaires et leur translocation dans la lumière du réticulum. Les prohormones y subissent des repliements et modifications, des N-glycosylations, la formation de liaisons disulfures ou encore des oligomérisations, par des enzymes de repliement et des protéines chaperonnes.

Les précurseurs d'hormones peptidiques quittent ensuite le réticulum endoplasmique, via des vésicules ayant bourgeonnées à partir de sa membrane, vers l'appareil de Golgi. Ils y subissent des modifications post-traductionnelles supplémentaires, des phosphorylations et maturations oligosaccharidiques, et sont ensuite agrégés et emballés sélectivement dans des GSCD au niveau du réseau trans golgi (*trans golgi network*, TGN) (Figure 9, 1B) (Mains et al., 1987).

Une voie constitutive a pour fonction de transporter, via des vésicules constitutives, les protéines de la matrice extracellulaire, les métalloprotéases ou encore des facteurs de croissance vers la membrane plasmique pour une libération immédiate, indépendante d'un stimulus (Figure 9, 2). Par ailleurs, le taux de sécrétion de cette voie commune à toutes les cellules est simplement fonction du taux de synthèse des substances sécrétées (Taupenot et al., 2003).

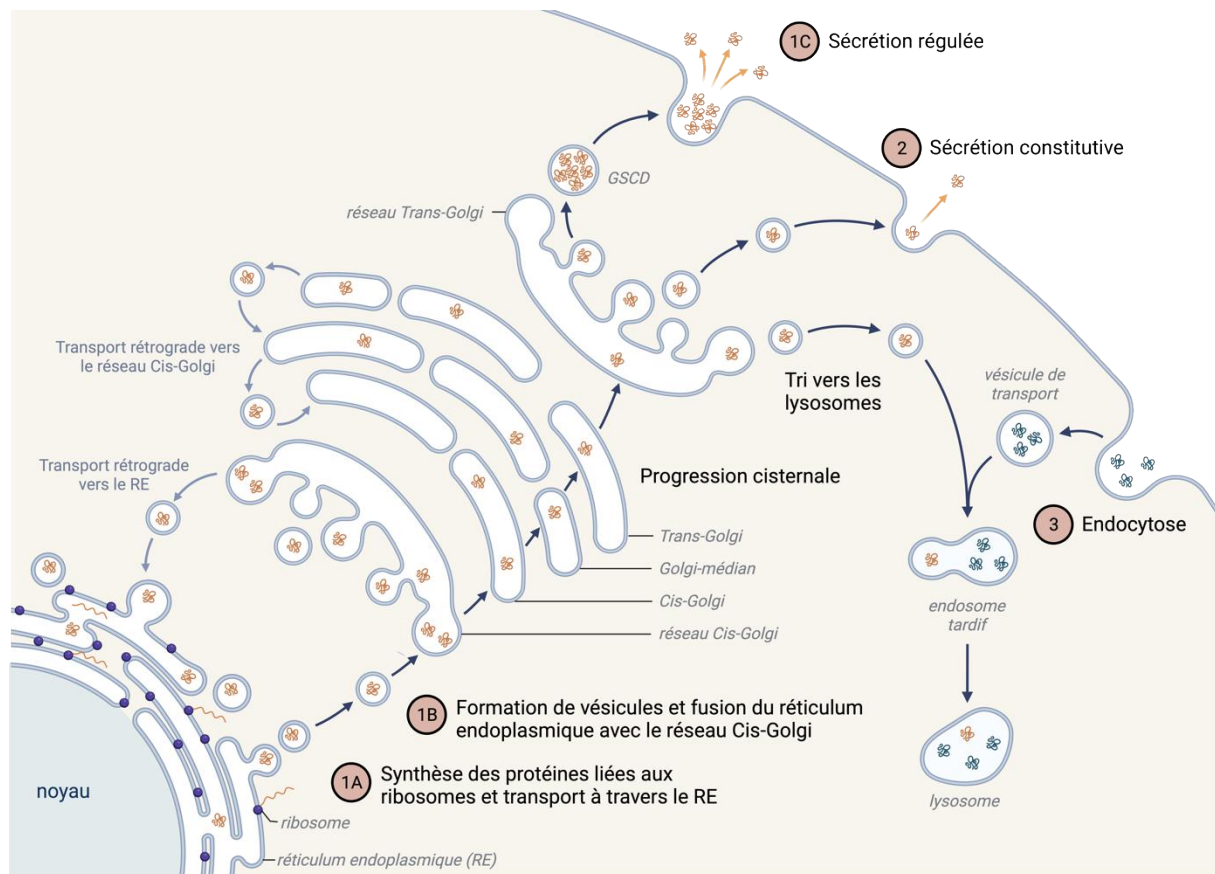


Figure 9 Deux voies distinctes de sécrétion sont présentes dans les cellules neuroendocrines

La voie régulée débute par la synthèse de protéines dans le réticulum endoplasmique (RE) (1A) et la biogenèse de vésicules à partir du réseau trans golgi (1B). Les granules de sécrétion mûrent et sont acheminées à la membrane plasmique (1C). À la suite d'une stimulation par le calcium, elles fusionnent afin de libérer leur contenu au niveau extracellulaire. La voie constitutive, présente dans tous les types cellulaires, ne requiert pas de stimulation pour l'exocytose (2). Une voie d'endocytose, correspondant à l'internalisation d'éléments présents dans le milieu extracellulaire, est également décrite (3).

#### 1.4.6.4. Biogenèse des granules de sécrétion à cœur dense de la voie régulée

La biogenèse des GSCD, encore immatures à cette étape, résulte de la courbure et du bourgeonnement de la membrane du TGN qui se distingue par son environnement riche en calcium (10-15 mM) et cholestérol, et au pH acide ( $\approx 6,5-6,2$ ) (Figure 10). Ces propriétés génèrent un lieu propice à l'agrégation des protéines destinées à la sécrétion. L'altération du pH entraîne notamment des perturbations de l'intégrité du granule néosynthétisé et une mauvaise orientation des protéines de la voie de la sécrétion régulée vers la voie constitutive (Paroutis et al., 2004).

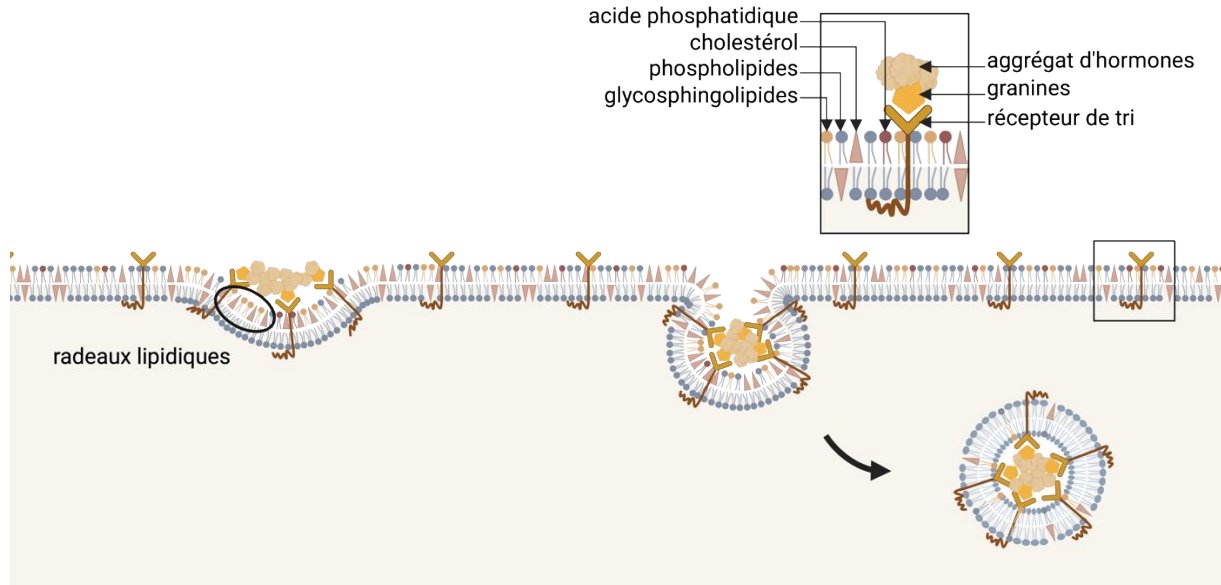


Figure 10 Rôle des lipides et des granines dans la biogenèse des vésicules de sécrétion au niveau du réseau trans golgi

Le cholestérol est un constituant majeur du radeau lipidique et joue un rôle clé dans la formation des courbures. L'acide phosphatidique et le diacylglycérol sont également impliqués dans ce processus. Leurs structures coniques favorisent le bourgeonnement de la membrane. Les agrégats de prohormones et granines interagissent avec les récepteurs de tri associés aux radeaux-lipidiques pour fournir une force motrice nécessaire au bourgeonnement des granules. Adapté de (T. Kim et al., 2006).

Ce processus est caractérisé par l'implication d'un large spectre de lipides aux propriétés spécifiques et leurs interactions avec des enzymes et autres protéines associées à la membrane. Le lieu de bourgeonnement des GSCD est singulièrement marqué par la formation de radeaux lipidiques correspondant à un assemblage du cholestérol membranaire et de glycosphingolipides dont la synthèse a été initiée dans le RE et achevée dans le Golgi (Figure 10) (Salaün et al., 2004; Simons & Toomre, 2000). Ces microdomaines participent au recrutement d'enzymes qui néosynthétisent des lipides présentant des propriétés de courbure. Par exemple, la phospholipase D, enzyme catalysant la conversion de la phosphatidylcholine (PC) en acide phosphatidique (*phosphatidic acid*, PA), est mobilisée (Tanguy et al., 2021). Par ailleurs, son inhibition pharmacologique dans des cellules PC12 ou son knockout (KO) dans des cellules chromaffines de souris entraîne une réduction de la biosynthèse des granules accompagnée d'une altération de leur forme et leur diamètre (Carmon et al., 2020). Ainsi, l'accumulation de cholestérol et de PA mais également de diacylglycérol (DAG), adoptant une forme conique dans cet environnement particulier, induit la modification des propriétés biophysiques de la membrane du TGN conduisant à sa déstabilisation, sa courbure et ainsi le bourgeonnement granulaire (Asp et al., 2009; Kooijman et al., 2003). Les constituants membranaires jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance des protéines destinées à la

sécrétion régulée, organisées sous forme d'agrégat facilitant leur ciblage dans les GSCD (Chanat & Huttner, 1991).

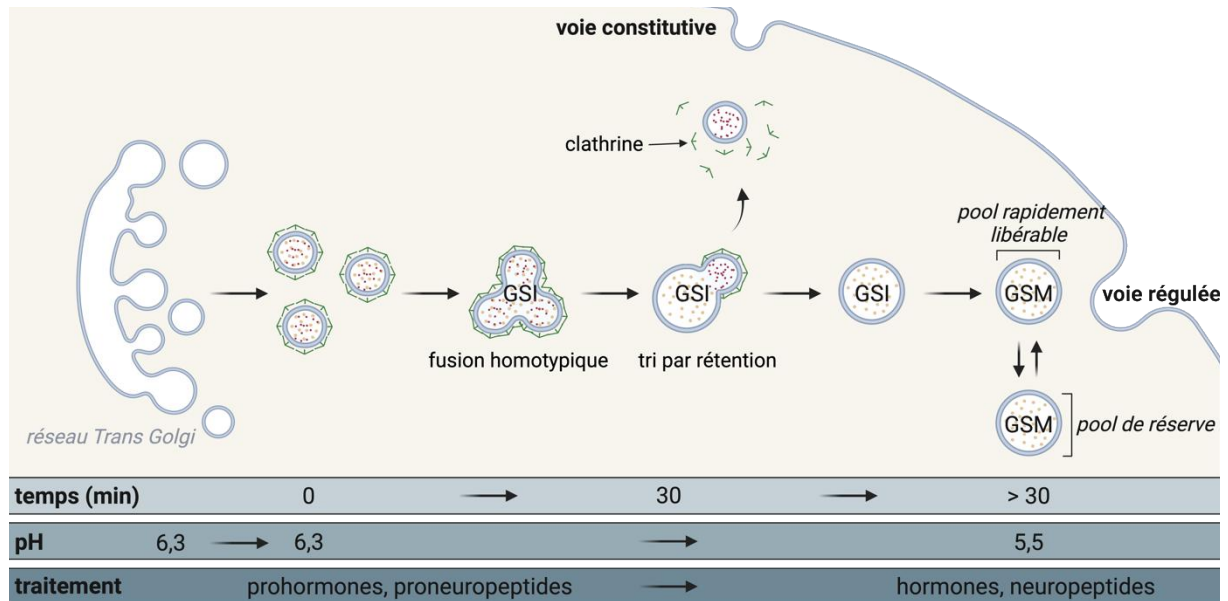
Les glycoprotéines de la famille des granines, les chromogranines A et B (CgA et CgB) ainsi que les sécrétogranines II à IV (SgII à SgIV), sont fondamentales dans ce processus d'agrégation grâce, en particulier, à leurs propriétés structurelles dont la forte proportion d'acides aminés (AA) acides dans leur séquence. Parmi ces protéines chaperonnes pour le tri des hormones, la CgA, représentant près de 40% des protéines solubles intravésiculaires (Crivellato et al., 2008), joue un rôle capital dans la reconnaissance de l'agrégat peptidique par la membrane du TGN. Notamment via ses deux régions C- et N-terminales conservées contenant deux motifs hélicoïdaux, elle interagit préférentiellement avec le PA (Carmon et al., 2020; Taupenot et al., 2002). Par ailleurs, sa déplétion entraîne une diminution importante et proportionnelle de la quantité de GSCD dans les cellules PC12 (T. Kim et al., 2001).

#### 1.4.6.5. Maturation et transport des granules de sécrétion à cœur dense

Au cours d'un processus de maturation complexe, les granules sécrétoires immatures (GSI) sont convertis en granules sécrétoires matures (GSM) (Figure 11). Les GSI, qui ne représentent qu'une faible proportion de la population totale des GSCD, ont une demi-vie d'environ 45 minutes dans les cellules neuroendocrines alors qu'elle est de plusieurs jours pour les GSM (Tooze et al., 1991). Immédiatement après leur bourgeonnement du TGN, se produit une acidification progressive de la lumière de ces organites, achevée en 90 minutes dans les cellules PC12 (Urbé et al., 1997). La diminution du pH, passant d'environ 6,3-5,7 à 5,5-5,0, est obtenue et régulée par une augmentation progressive de la densité de pompes actives à protons (*vacuolar-ATPase*, V-ATPase) et une diminution de la perméabilité aux protons des membranes vésiculaires. Le gradient de protons qui en résulte entraîne l'absorption des monoamines du cytosol médiée par les transporteurs et l'activation de prohormones convertases et de carboxypeptidases nécessaires à la transformation des prohormones et proneuropeptides en peptides bioactifs (Johnson, 1988). La maturation des GSCD comprend également le raffinement du contenu et le remodelage de la membrane. Au cours de ce « tri par rétention », les protéines non destinées aux GSM sont éliminées avec l'excès de membrane par la formation de bourgeons recouverts de clathrine à la surface des GSI (Figure 11) (Arvan & Castle, 1998; Tooze, 1998). Un phénomène de fusion homotypique des GSI à l'origine d'une augmentation de la taille des GSM est également observé. Ce processus implique notamment la protéine *N-ethylmaleimide-sensitive fusion* (Nsf) (Urbé et al., 1998), son cofacteur *soluble Nsf attachment*



*protein* (Snap), la syntaxine 6 (Stx6) (Wendler et al., 2001) ou encore la synaptotagmine 4 (Syt4) (Ahras et al., 2006).



*Figure 11 Formation et maturation des granules de sécrétion dans les cellules neuroendocrines*

Après leur bourgeonnement au niveau du TGN, les granules de sécrétion immatures (GSI) subissent différentes étapes de remodelage et de raffinement de leur contenu. Les granules de sécrétion matures (GSM) formées sont transportés vers la membrane plasmique afin de libérer leur contenu à la suite d'une stimulation. *Adapté de* (Kögel & Gerdes, 2009).

Après leur biogenèse, les GSI se déplacent le long de microtubules vers le cortex, à la périphérie cellulaire. Cette translocation unidirectionnelle vers l'extérieur, impliquant les kinésines mais pas les dynéines, s'opère en quelques secondes (Rudolf et al., 2001). À leur arrivée, bien que limités au cortex riche en filaments d'actine (F-actine), ils se déplacent activement dans toutes les directions, mûrent et convergent vers les pools de réserve recrutés lors d'épisodes de stimulation soutenue et d'exocytose de longue durée (Almers, 1990; Neher & Zucker, 1993). Dans les cellules chromaffines, seul 1% des GSCD est rapidement libérable, subissant une exocytose immédiate sous forte stimulation (pouvant correspondre à 10-20 Hz) (Brandt et al., 1976; Fulop et al., 2005; Holman et al., 1994). Afin d'intégrer ce pool, les GSCD subissent plusieurs étapes d'amorçages, à une concentration intracellulaire basale de calcium (0,1 – 2  $\mu$ M) (Álvarez et al., 2008; Horrigan & Bookman, 1994). Une sécrétion basale de ce pool a toutefois été décrite à faible fréquence de stimulation (0,2- 0,5 Hz).

#### 1.4.6.6. Exocytose des granules de sécrétion à cœur dense

Le mécanisme de libération du contenu des GSCD s'achève par leur fusion avec la membrane plasmique, médiée par le complexe multiprotéique *soluble Nsf sensitive factor attachment protein receptors* (SNARE) (Figure 12, A). Celui-ci est constitué de la syntaxine 1 (Stx1), la

*synaptosomal-associated protein 25* (Snap25) et la synaptobrévine 2 (*vesicle-associated membrane protein 2*, Vamp2) définies par la présence de motifs SNARE d'environ 60 résidus chargés et présentant un grand potentiel à former des hélices. Au sein de Vamp2 et Stx1, ces séquences caractéristiques sont précédées d'une région transmembranaire qui s'ancre respectivement sur la membrane vésiculaire et la membrane plasmique (Fasshauer et al., 1998). De plus, Snap25 possède deux motifs SNARE reliés par un linker central palmitoylé sur ses multiples résidus de cystéine qui assure l'ancrage à la membrane plasmique (Veit et al., 1996). Une fois associés, ces motifs forment le complexe trans-SNARE, un faisceau serré à quatre hélices  $\alpha$ , contraignant ainsi les régions transmembranaires C-terminales des protéines SNARE à un contact étroit et réunissant ainsi les deux membranes (Hanson et al., 1997).

Bien qu'elles présentent une structure C-terminale similaire, Stx1 diffère de Vamp2 par sa séquence N-terminale, composée d'environ 180 résidus formant un faisceau de trois hélices (Margittai et al., 2003). Ce domaine Habc se replie de manière réversible sur le motif SNARE de Stx1 à l'origine d'une conformation « fermée » de la protéine. Cette forme auto-inhibée de Stx1 est spécifiquement maintenue par la protéine 1 de liaison à Stx1 ou *mammalian uncoordinated-18* (Munc18) également appelée *syntaxin binding protein 1* (Stxbp1), empêchant ainsi la formation du complexe SNARE (Figure 12, B) (Dulubova, 1999). La constitution de celui-ci nécessite au préalable l'élaboration d'une zone active, propice à l'exocytose. Composée d'un réseau protéique complexe, elle orchestre le recrutement de canaux calciques, l'arrimage des GSCD à la membrane et leur activation pour la fusion. Ainsi, la levée de l'inhibition de la Stx1, correspondant à l'acquisition d'une conformation « ouverte », nécessite l'intervention de la protéine *mammalian uncoordinated-13* (Munc13), une protéine de la zone active caractérisée par un domaine N-terminal C2A et un domaine C-terminal MUN (Figure 12, C). Elle interagit, via son domaine MUN, avec les partenaires du complexe SNARE (D. R. Stevens et al., 2005). Afin d'être effective, la protéine nécessite toutefois d'être liée, via son domaine C2A, à une protéine *regulating synaptic membrane exocytosis* (*Rab3-interacting molecule*, Rim), partenaire des GTPases Rab3 attachées aux granules (Betz et al., 2001; Dulubova et al., 2005). De façon intéressante, la protéine Rim se lie également à d'autres protéines de ce réseau telles que les *Rim binding-proteins* (Rim-bp), les *ETS transcription factor* (Elk) ou encore les  $\alpha$ -liprines (Schoch et al., 2002; Y. Wang et al., 2002). Par ailleurs, ce complexe protéique de la zone active est également composé de Piccolo (Pclo et Bassoon (Bsn) et soutenu par les protéines adaptatrices *calcium/calmodulin-dependant serine protein kinase* (Cask), Mint et Velis (Fenster et al., 2000; tom Dieck et al., 1998).

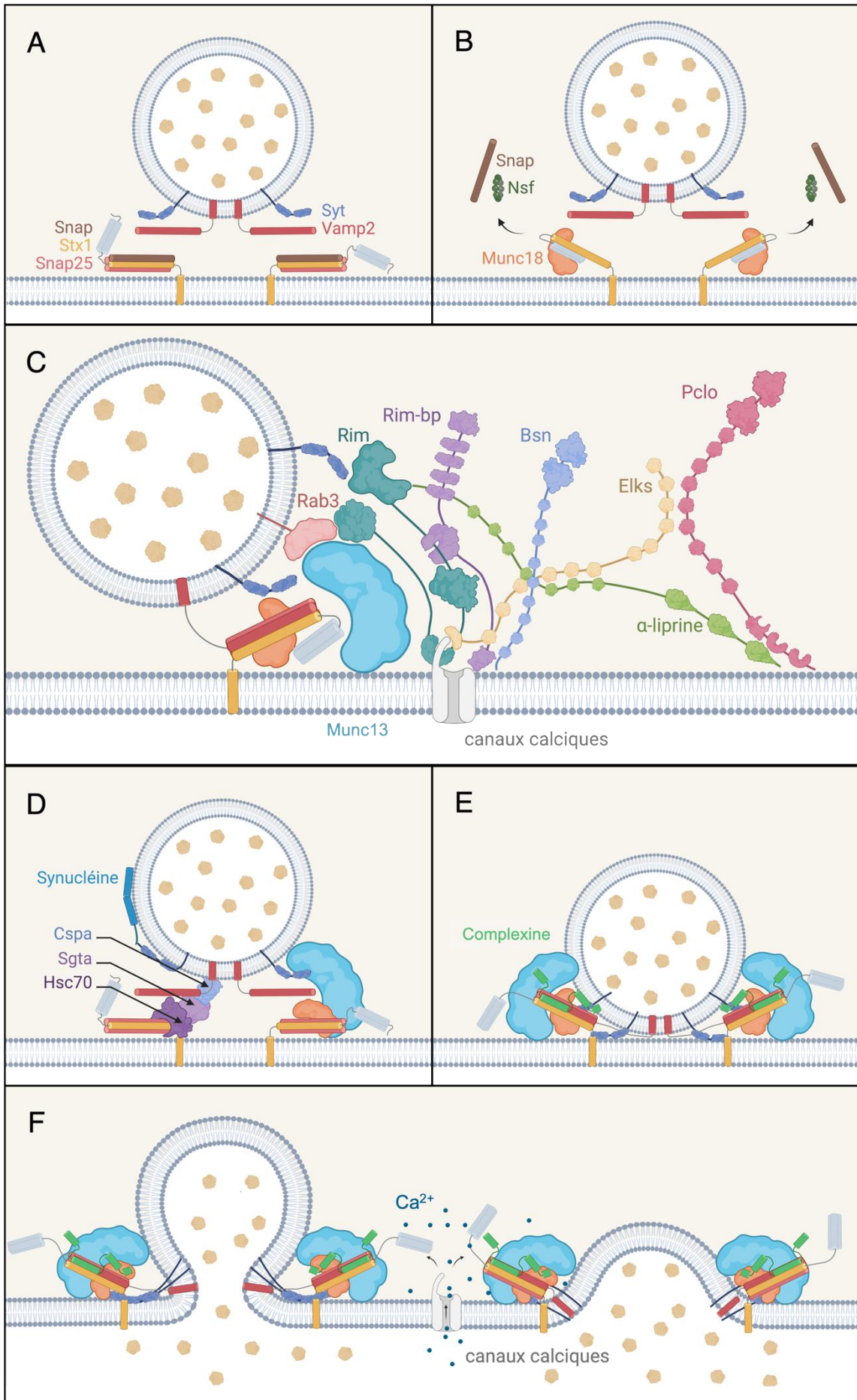
Des protéines chaperonnes, guidant le repliement correct des protéines SNARE, ont également été identifiées. Par exemple, la protéine *cold shock protein alpha* (Cspa) forme avec Hsc70 (ou Hspa8) et la *small glutamine rich tetratricopeptide repeat* (Sgta), un complexe chaperon dépendant de l'ATP qui catalyse le repliement correct de Snap25, la rendant compétente pour la formation du complexe SNARE (Figure 12, D) (Sharma et al., 2011; Tobaben et al., 2001). Une activité similaire, toutefois indépendante de l'ATP, a été attribuée aux synucléines (Burré et al., 2010). En effet, celle-ci favorise l'assemblage du complexe SNARE en se liant directement à Vamp2.

Ainsi, par l'ouverture de Stx1 et sous le contrôle des protéines calciphosines (Caps) qui stabilisent cette conformation, Munc13 initie la formation du complexe SNARE en établissant ainsi un pont entre le granule et la membrane plasmique prêts à fusionner. Toutefois, cet assemblage à l'extrémité N-terminale est partiel et nécessite un influx de calcium pour être finalisé par un mécanisme de « fermeture éclair » à l'extrémité C-terminale (Sørensen et al., 2006). Cet influx est perçu par les senseurs de calcium dont la synaptotagmine 1 (Syt1), déclenchant ainsi la formation d'un pore de fusion et la libération de catécholamines facilitées par des interactions avec les phospholipides. Par ailleurs, Syt1 fonctionne en étroite interaction avec les complexines (Cplx) et se lie au complexe SNARE partiellement assemblé afin de le stabiliser tout en empêchant la fermeture prématurée de celui-ci en absence de stimulation de la cellule (Figure 12, E) (McMahon et al., 1995). De façon intéressante, d'autres capteurs de calcium tels que les isoformes de la synaptotagmine et la protéine *double c2 domain*  $\beta$  (Doc2b) ont également été identifiés (Groffen et al., 2010). Le taux de calcium intracellulaire, augmentant au cours de la stimulation cellulaire, stimule l'interaction de Syt1 avec le complexe SNARE, les phospholipides et les canaux calciques et inhibe l'interaction de Syt1 avec les protéines de transport *synaptic vesicle glycoprotein 2* (Sv2) qui le régulent (Janz et al., 1999; Lazzell et al., 2004).

Les synaptotagmines (Syt) présentent une affinité différente pour le calcium conduisant à des modes de libération de catécholamines, d'expansion du pore de fusion et d'exocytose distincts (Fernández-Chacón et al., 2001) Dans les cellules PC12, la synaptotagmine 7 (Syt7) présente une faible cinétique d'activation par le calcium mais une forte affinité pour celui-ci (Bacaj et al., 2013; Bhalla et al., 2005). Elle se localise dans des vésicules d'une taille moyenne de 148 nm et favorise sa fusion totale à la membrane plasmique (Z. Zhang et al., 2011). Ainsi, lors d'une stimulation à forte fréquence (15 Hz), la « full fusion » permet la libération en quelques millisecondes, d'une quantité importante de produits de sécrétion (Crivellato et al., 2008; Fulop

et al., 2005) (Figure 12, F). Alors que Syt1 est plus rapidement activée par le calcium, elle se localise dans des granules plus petits, d'une taille moyenne de 108 nm et semble favoriser sa fusion partielle avec la membrane plasmique. Ce mode de libération dit de « kiss-and-run » s'opérant lors de stimulations à basse fréquence (0,5 Hz), induit l'ouverture d'un pore de fusion transitoire où seules les petites molécules contenues dans les granules dont les catécholamines vont être libérées (Figure 12, F) (Palfrey & Artalejo, 2003). L'augmentation du taux de calcium intracellulaire influence également l'expansion du pore de fusion en favorisant la formation de nouveaux filaments d'actine et en perturbant le réseau cortical préexistant (Gasman et al., 2004; Trifaró et al., 2000).

Après la fusion membranaire, les complexes cis-SNARE sont désassemblés par l'ATPase Nsf après avoir été recrutée par sa protéine adaptatrice Snap reconnaissant le complexe (Banerjee et al., 1996; Söllner et al., 1993). De façon intéressante, cette dissociation prévient également des exocytoses non régulées par ce processus complexe. En effet, seules les protéines Munc18 et Munc13 organisent l'assemblage du complexe SNARE d'une manière résistante au complexe Nsf-Snap. Syt1 et les Cplx, en se liant à ce complexe SNARE contribuent également à la protection contre le désassemblage par Nsf-Snap.



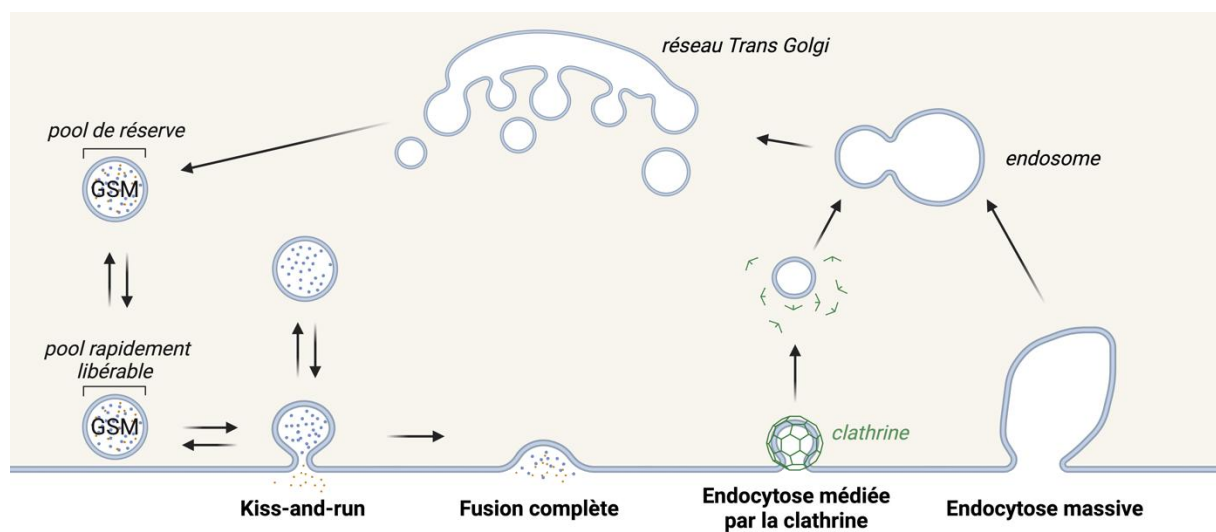
### Figure 12 Principales étapes de l'exocytose

A) Localisation de la synaptobrevine (Vamp2) et la synaptotagmine (Syt) sur une vésicule synaptique et de l' $\alpha$ -Snap (Snap) liée à un complexe entre Snap25 et la syntaxine 1 (Stx1) sur la membrane plasmique. Les hélices formées par les protéines SNARE sont représentées par des cylindres. La liaison de Snap au complexe Stx1-Snap25 empêche la liaison à Vamp2 et la formation du complexe SNARE. B) Stx1 adopte une conformation fermée qui se lie étroitement à Munc18. Ce complexe constitue le point de départ de la voie d'exocytose. Stx1 fermée peut être disponible sur la membrane plasmique ou peut se former après que la Nsf dissocie un complexe Stx1-Snap25 lié à Snap. C) Parmi les protéines de la zone active, un complexe composé des six composants canoniques des zones actives, Munc13,  $\alpha$ -liprines, Rim et Rim-bp ainsi que Elks et Piccolo/Bassoon (Pclo/Bsn) se liant à la périphérie est représentés. Le complexe est ancré sur les vésicules synaptiques par la liaison de Rim à Rab3 et sur la membrane plasmique par la liaison directe de Rim et Rim-bp aux canaux calciques. D) Les protéines SNARE sont soumises à des réactions continues de repliement et de dépliement. De potentiels mauvais repliements sont contrecarrés par les protéines chaperonnes classiques CSP $\alpha$ , HSC70 et Sgt1 qui forme un complexe et se lient à Snap25 sur la membrane cible. Les synucléines, des chaperonnes non classiques, sont liées aux phospholipides et à Vamp2 sur les vésicules et se lient aux complexes SNARE en cours d'assemblage pour soutenir leur repliement. E) La liaison de la complexine favorise la fermeture C-terminale du complexe SNARE initié rapprochant les deux membranes. F) La liaison du Ca<sup>2+</sup> à Syt entraîne la dissociation du complexe SNARE, levant l'inhibition et permettant ainsi la fermeture finale de l'extrémité C-terminale et la fusion des vésicules synaptiques. Deux types de fusions sont représentées, la fusion dite de « Kiss-and-run » (gauche) et la fusion complète ou « Full fusion » (droite). *Adapté de (Sudhof & Rizo, 2011) et (Rizo, 2022).*

#### 1.4.6.7. Couplage exocytose-endocytose

Finalement, les protéines dissociées du complexe synaptique sont recyclées pour de nouveaux cycles de libération de neurotransmetteurs. Les composants membranaires impliqués dans cette machinerie sont également recaptés par endocytose compensatoire correspondant au bourgeonnement de la membrane plasmique vers l'intérieur de la cellule (Houy et al., 2013). La formation de vésicules par invagination membranaire permet notamment de compenser l'apport de membrane et de maintenir une surface cellulaire constante. À ce sujet, différents types d'endocytose, présentant des caractéristiques distinctes en termes de vitesse et de mécanismes moléculaires sont décrits (Figure 13). On distingue généralement les processus dépendants et indépendants de la clathrine, une protéine structurale constituant une enveloppe (ou un manteau) des vésicules lors de l'endocytose. Premièrement, l'endocytose « kiss-and-run » décrite comme étant rapide (<1-2 s), correspond à une récupération partielle des granules de sécrétion faisant suite à leur exocytose sans fusion complète avec la membrane (Chanaday et al., 2019; Fesce et al., 1994) (Figure 13). Contrairement à celle-ci, l'endocytose médiée par la clathrine, est un processus lent (10-30 s) permettant la récupération complète des GSCD ayant fusionné (Milosevic, 2018). Une endocytose ultrarapide, se produisant en seulement 50 ms après une exocytose et se poursuivant pendant quelques secondes, a été également décrite (Watanabe et al., 2013). La membrane à la périphérie de la zone d'actine s'invagine pour former une grande vésicule endocyttaire acheminée vers les endosomes synaptiques à partir desquelles des vésicules vont être régénérées en bourgeonnant sous une forme enrobée de clathrine (Figure 13). Ce processus est conditionné par la tension membranaire et de la clairance immédiate de la membrane de la zone active modulées par la synaptojanine, l'endophiline ou encore la

dynamine et l'actine (Jäpel et al., 2020; Milosevic et al., 2011; Shi & Baumgart, 2015; Verstreken et al., 2003). Finalement, en cas d'activité intense, une grande surface de membrane invaginée est hâtivement récupérée (<1-2 s) et forme un endosome (en vrac) à partir duquel des vésicules fonctionnelles sont générées (Figure 13) (Cheung et al., 2010; Kononenko & Haucke, 2015). Cette récupération de la membrane mais également des protéines vésiculaires telles que Vamp2, la synaptophysine ou encore les VMAT, est indépendante de la clathrine mais implique d'autres acteurs protéiques tels que l'actine ou encore la calcineurine, une phosphatase dépendante du calcium (Kokotos et al., 2018; Kononenko & Haucke, 2015; Soykan et al., 2017).



*Figure 13 Couplage exocytose-endocytose dans les cellules neuroendocrines*

En mode « kiss-and-run », seules les petites molécules dont les catécholamines, sont libérées à travers un pore de fusion étroit. Lors de l'exocytose complète, le contenu intracellulaire est entièrement libéré et la membrane du granule fusionne entièrement avec la membrane plasmique. Cette incorporation de la membrane est compensée par l'endocytose médiée par la clathrine qui récupère spécifiquement la membrane du granule. Après avoir été désenrobée, la membrane des granules endocytés atteint l'endosome précoce où les composants des granules restent regroupés avant d'être rematurée dans le réseau de Golgi. Lors d'une activité d'exocytose intense, l'endocytose massive soutient l'endocytose médiée par la clathrine en internalisant de grandes invaginations de la membrane plasmique. *Adapté de (Houy et al., 2013).*

## 2. Dérégulation de l'homéostasie dans les tumeurs neuroendocrines, cas du phéochromocytome

### 2.1. Tumeurs neuroendocrines et rupture de l'homéostasie

L'équilibre homéostatique de l'organisme est en partie préservé par le système neuroendocrinien, notamment via l'activité sécrétrice des cellules qui le composent. Par ailleurs, cette harmonie nécessite une communication tissulaire finement régulée par des processus physiologiques de régénération cellulaire. À l'échelle de la cellule, la taille et la fonction des tissus sont contrôlées par une machinerie moléculaire complexe impliquant une reconnaissance et une interprétation des signaux environnants permettant l'orientation du devenir de la cellule vers la prolifération, la différenciation, la survie ou encore l'apoptose. Ainsi, une perturbation de ces mécanismes de régulation, notamment lors de l'induction d'une carcinogenèse, entraîne la perte de cette homéostasie cellulaire et tissulaire. De plus, du fait de leur fonction hormonale, l'induction de néoplasmes à partir de cellules neuroendocrines perturbe également l'homéostasie à l'échelle systémique.

Les tumeurs neuroendocrines (TNE) se développent à partir des cellules du système neuroendocrinien, préférentiellement au sein du tractus gastrointestinal (48%), les poumons (25%), le pancréas (9%) mais pouvant également se développer dans de nombreux autres organes tels que la glande surrénale. Outre leur aspect oncogénique, ces néoplasmes sont caractérisés par une dérégulation de la libération des hormones, entraînant leur hypersécrétion, pouvant être à l'origine de manifestations cliniques. De façon intéressante, ces tumeurs, alors dites fonctionnelles, sont susceptibles d'être diagnostiquées plus précocement, les peptides bioactifs pouvant servir de biomarqueurs. Parmi ces derniers, la CgA et la Synaptophysine (Syn) sont les plus fréquemment utilisées pour le diagnostic d'une TNE, bien que leur sensibilité et leur spécificité ne soient pas optimales (Eriksson et al., 2000; Lawrence et al., 2011). Aussi, la mesure des biomarqueurs actuels incluant la pancréastatine (Pst), la neurokinine A (Nka) ou encore la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) est également considérée comme insuffisante pour identifier avec précision la tumeur primaire (Oberg et al., 2015). Récemment évalué, Stx1 semble être un marqueur robuste de la différenciation des neurones et prometteur pour le diagnostic (Kóvári et al., 2020). L'identification précoce d'une TNE est associée à une réduction de la morbidité et la mortalité (Basuroy et al., 2018). Toutefois, les erreurs et retards de diagnostic sont fréquents, ces néoplasmes étant perçus comme relativement rares et aux symptômes non spécifiques. Néanmoins, ces dernières décennies, l'amélioration des méthodes



et outils de diagnostic a conduit à augmenter l'incidence des TNE, estimée à 25 à 50 cas par million de personnes par an (White et al., 2022).

## 2.2. Le phéochromocytome, une tumeur neuroendocrine hypersécrétante

### 2.2.1. Histoire du premier cas de phéochromocytome observé

Le premier cas de phéochromocytome est décrit par Felix Fränkel en 1884 (Frankel, 1984). Minna Roll, alors âgée de 19 ans, est sujette depuis plus d'un an à de sévères palpitations cardiaques, vertiges, maux de tête et vomissements. Elle se présente au centre hospitalo-universitaire de Fribourg où sa fréquence cardiaque est décrite comme élevée et rapidement changeante, allant de 112 à 180 battements par minute (bpm). De plus, elle est dépeinte dans un état d'anxiété extrême, de sorte qu'elle sursaute d'horreur à chaque bruit ou mouvement de ceux qui l'entourent. Elle décèdera, 10 jours après son admission, d'une insuffisance circulatoire.

L'autopsie, réalisée par Rudolf Maier et Max Schottelius, révèle alors le premier cas de tumeurs surrenaliennes bilatérales observé. Au-dessus du pôle supérieur du rein gauche, se trouve une tumeur de la taille d'un poing. Une seconde, de plus petite taille, est retrouvée dans la glande surrénale droite. Un examen histologique approfondi, après fixation dans une solution de Müller, atteste de la nature angiogénique de la tumeur surrenalienne gauche. C'est la composition même de cette solution de fixation qui va donner au phéochromocytome son nom. Les coupes ainsi préparées présentent un aspect granulaire et marbré de zones jaunes à brunes foncées à la suite d'une réaction des catécholamines aux chromates présents (Ogata & Ogata, 1917). D'autres cas de tumeurs surrenaliennes d'origine médullaire mais également extra-surrenalienne, présentant ces similitudes de couleur après fixation, furent décrits ultérieurement et nommés « paragangliomes » (PGL) (Alezais & Peyron, 1908). Le terme « phéochromocytome » (PCC) tiré du grec « phaeo » brun, « chromo » couleur et « cyto » cellule, est finalement introduit par Ludwig Pick en 1912 pour décrire les PGL intra-surréaliens (Pick, 1912).

### 2.2.2. Le PPGL, une tumeur de la cellule chromaffine

Avec une incidence mondiale estimée de 2 à 10 cas par million de personnes par an, les PGL sont des tumeurs neuroendocrines rares qui se développent aux dépens des cellules chromaffines dérivant de la crête neurale et appartenant au système neuroendocrinien (Ebbehoj et al., 2021). Alors que les PCC sont majoritaires, les PGL extra-surréaliens ne représentent

que 15-20% des cas. Ces derniers sont classés en fonction du type de paraganglia dont ils sont originaires. Ainsi, les PGL extra-surréaliens parasymphatiques, généralement bénins et à croissance lente (Niemann & Müller, 2000), se développent aux dépens des ganglions parasymphatiques retrouvés généralement au niveau de la tête et du cou. Quatre sites primaires majeurs sont toutefois retenus ; le corps carotide, le foramen jugulaire, le long du nerf vague et l'oreille moyenne (Figure 14). Les PGL extra-surréaliens sympathiques se développent à partir des cellules chromaffines situées le long des nerfs sympathiques, généralement dans la poitrine, l'abdomen ou le bassin.



*Figure 14 Localisation des phéochromocytomes et des paragangliomes*

Alors que le phéochromocytome est médullo-surrénalien (gauche), le paragangliome extra-surrénalien se développe aux dépens des ganglions parasymphatiques au niveau de la base du crâne, du cou, du thorax, de l'abdomen et du pelvis (droite).

### 2.2.3. Hypersécrétion de catécholamines et symptômes du PPGL

Tandis que les PGL extra-surréaliens parasymphatiques tendent à être non fonctionnels, les PCC et PGL extra-surréaliens sympathiques regroupés sous le terme de PPGL, se caractérisent par une dérégulation des voies de biosynthèse et de sécrétion des catécholamines, à l'origine de manifestations cliniques délétères pour l'organisme. Notamment, l'activité de la TH, de l'AADC et de la DBH augmente dans le PCC humain par rapport à la médullo-surrénale normale (Jarrott & Louis, 1977). Ces résultats sont appuyés par des observations immunohistochimiques qui corrént, au même titre, avec une augmentation des niveaux d'ARNm codant ces enzymes (Isobe et al., 1998). Inversement, la concentration en ARNm de la PNMT dans le PCC est inférieure, cela pouvant, en partie, être expliqué par de plus faibles concentrations de glucocorticoïdes atteignant les tissus tumoraux (Feldman, 1981). Plus récemment, il a été montré que LAT1 et dans une moindre mesure LAT2, les transporteurs des acides aminés de type L, sont surexprimés dans le PCC par rapport à la médullosurrénale saine,

facilitant ainsi l'apport de la L-tyrosine comme substrat pour l'augmentation de la synthèse de catécholamines (Barollo et al., 2016). Il en résulte une hyperproduction de catécholamines de ces cellules tumorales en expansion anarchique, participant ainsi à l'amplification de leur décharge au sein de l'organisme.

Les symptômes et signes de ces PPGL reflètent essentiellement les effets de cette hypersécrétion de catécholamines, relarguées massivement dans la circulation sanguine, sur les récepteurs adrénergiques de l'organisme. Ainsi, les patients atteints d'un PPGL développent une hypertension artérielle (80-90%), soutenue (50-60%) ou paroxystique (30%), bien qu'ils ne représentent que 0,1% des patients hypertendus (Mittendorf et al., 2007; Pederson & Lee, 2003). De plus, des palpitations, céphalées et diaphorèse, regroupés sous le terme de triade de Ménard, associés à d'autres symptômes, également non spécifiques, sont rapportés (Tableau 2). En outre, ces manifestations catécholaminergiques peuvent engendrer des complications cardiovasculaires potentiellement mortelles telles qu'une cardiomyopathie Takotsubo (Ghadri et al., 2018). Des effets métaboliques comme un diabète ou un prédiabète, induits par une hyperglycémie chez le patient jeune hypertendu, sont aussi associés à un état hyperadrénergique résultant d'un PPGL (La Batide-Alanore et al., 2003; Verberne et al., 2016).

*Tableau 2 Symptômes des patients atteints de phéochromocytome Adapté de (Pederson & Lee, 2003) et (Cornu et al., 2019).*

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

Les contenus en catécholamines des PPGL sont très variables, tant en termes de quantités totales que relatives. La sécrétion d'adrénaline et de noradrénaline tumorale peut être continue et/ou épisodique et affecte ainsi la fluctuation et la variabilité des symptômes (Fung et al., 2007). De faibles quantités de catécholamines circulantes et une libération intermittente de celles-ci sont associées à une présentation clinique modeste (Zuber et al., 2011). Les patients porteurs d'un

PPGL adrénérique, dont la sécrétion est généralement épisodique, souffrent d'une hypertension paroxystique et orthostatique. Au contraire, les patients PPGL noradrénériques sont plus susceptibles de présenter une hypertension soutenue (Y. Lu et al., 2016). D'autres facteurs tels que le stress, l'activité physique, le changement de posture, la compression de la tumeur ou encore l'administration de médicaments peuvent être des éléments déclencheurs de cette libération massive d'hormones (Eisenhofer et al., 2007; Raber et al., 2000).

La rareté des PPGL et la variabilité de leurs symptômes représentent un écueil majeur au diagnostic. La tumorigenèse peut notamment rester silencieuse dans un premier temps, les catécholamines biologiquement actives étant converties, au sein de la tumeur, en métanéphrines inactives par la COMT (Crout & Sjoerdsma, 1964; Feldman et al., 1979; Lenders et al., 2002). De surcroît, dans 10 à 25% des cas, les symptômes sont inexistantes rendant ces PCC silencieux. Les patients sont alors généralement normotendus (PN) et les niveaux de catécholamines et métanéphrines urinaires, principalement l'adrénaline et la métadrénaline sont alors réduits de 3 à 6 fois par rapport aux formes symptomatiques (Haissaguerre et al., 2013). Toutefois, aucune différence significative de la taille tumorale n'est rapportée, suggérant que ces PN ne représentent pas un stade précoce du développement du PCC mais correspondent à une entité distincte caractérisée par des défauts dans la machinerie cellulaire et vésiculaire, propre aux cellules chromaffines. Notamment, des niveaux transcriptomiques de PNMT mais également de SGII sont significativement plus faibles dans les PCC silencieux que dans les PCC symptomatiques (Haissaguerre et al., 2013; Y. Lu et al., 2016). Découverts généralement de manière fortuite lors d'examens radiologiques par exemple, ces PCC alors dits incidentaux peuvent également être découverts à l'autopsie, contribuant à la mort du patient dans plus de 50% des cas (Sutton et al., 1981). Par ailleurs, des séries d'autopsies ont révélé une prévalence plus élevée du PPGL (1:2000) que celle estimée (entre 1:65000 et 1:2500) (McNeil et al., 2000).

#### 2.2.4. Diagnostic du PPGL

Les effets délétères de cette libération excessive de catécholamines par la tumeur sont à l'origine de symptômes non-spécifiques rendant le diagnostic du PPGL complexe. Ainsi, le dépistage de première ligne repose sur la mise en évidence de l'hypersécrétion tumorale des catécholamines principalement via la mesure plasmatique libre et/ou la mesure de l'excrétion urinaire sur 24 heures de leurs métabolites (Grossman et al., 2006). En particulier, avec une sensibilité de 97% et une spécificité de 95%, les mesures de métanéphrines et de normétanéphrines libres plasmatiques sont les tests les plus précis pour détecter ou exclure un PPGL (Eisenhofer et al., 2018). De ce fait, l'augmentation de tout métabolite plasmatique

supérieure à deux fois le seuil de référence supérieur, soit 2,2 nmol/l pour les métanéphrines et 1,2 nmol/l pour les normétanéphrines, est très rares chez les individus sains (Lenders et al., 2002). Or, cette hausse se produit chez plus de 80% des patients atteints de PPGL, servant ainsi de forte valeur prédictive positive. Ces tests biochimiques peuvent également inclure la mesure plasmatique de la 3-méthoxytyramine, le métabolite O-méthylé de la dopamine, permettant de détecter les cas rares (5-10%) de PPGL dopaminergiques asymptomatiques, ne présentant pas les symptômes cardiovasculaires et métaboliques habituellement associés au PPGL (Rao et al., 2017).

A posteriori, une confirmation du diagnostic biochimique par imagerie est réalisée. Un bilan exhaustif comprenant de l'imagerie conventionnelle et/ou fonctionnelle est requis, permettant une détermination précise de la tumeur primaire et éventuellement une identification de localisations secondaires et/ou métastatiques. Pour cela, les directives émises au sein de l'« Endocrine Society Clinical Practice Guideline », définissent le *computed tomography scan* (CT-scan) comme imagerie de premier choix, sa sensibilité et son excellente résolution spatiale pour l'imagerie thoracique, abdominale et du bassin étant notamment adaptée à la survenue majoritaire (85%) d'un PPGL surrénalien (Lenders et al., 2014). L'alternative recommandée en cas de risque lié à l'injection du produit de contraste de la tomographie ou chez les patients pour lesquels l'exposition aux radiations doit être limitée, est l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

De nombreuses modalités fonctionnelles ont été développées sur la base des propriétés biochimiques de la tumeur. Ainsi, l'imagerie moléculaire basée sur le métabolisme des catécholamines permet d'identifier efficacement la tumeur. Pour cela, la scintigraphie métaiodobenzylguanidine radiomarquée ( $^{123}\text{I}/^{131}\text{I}$ -MIBG) est la technique d'imagerie la plus courante et notamment employée lorsqu'une radiothérapie à  $^{131}\text{I}$ -MIBG est prévue. Cet analogue métaboliquement stable de noradrénaline est absorbé par les vésicules de neurosécrétion et permet ainsi la détection scintigraphique de la tumeur proportionnellement à sa densité granulaire (Havekes et al., 2008). De même, une première étude chez l'homme avec le  $^{18}\text{F}$ -métafluorobenzylguanidine ( $^{18}\text{F}$ -MFBG), analogue du  $^{18}\text{F}$ -MIBG, pour la tomographie par émission de positons (TEP) a montré des résultats prometteurs (Pandit-Taskar et al., 2018). La  $^{18}\text{F}$ -fluorodihydroxyphénylalanine ( $^{18}\text{F}$ -FDOPA), absorbée par les transporteurs d'acides aminés LAT1 et LAT2, décarboxylée en  $^{18}\text{F}$ -fluorodopamine par l'AADC et finalement concentrée dans les granules, est une modalité très sensible (>90%) et spécifique (95-100%) pour la détection des PPGL (Hoegerle et al., 2002; Pacak et al., 2001; Timmers et al., 2009).

De plus, elle présente l'avantage de ne pas être captée par le tissu surrénalien sain permettant ainsi la détection de multiples PCC pouvant coexister au sein d'une même glande. Finalement, d'autres modalités spécifiques, dont la détection des récepteurs à la somatostatine (*somatostatin receptor*, SSTR) exprimées par les cellules neuroendocriniennes, ou non-spécifiques peuvent également être appliquées au PPGL. Par exemple, la TEP au <sup>18</sup>F-fluorodésoxyglucose (F-FDG), capté par les cellules tumorales via les transporteurs membranaires du glucose et phosphorylé en <sup>18</sup>F-FDG-6P, n'est pas pris en charge par les voies enzymatiques (Taïeb et al., 2009). Il s'accumule ainsi proportionnellement au taux glycolytique cellulaire. Ce phénomène, caractéristique d'un développement tumoral, est également retrouvé dans le PPGL.

#### 2.2.5. Le PPGL métastatique, un diagnostic impossible ?

Alors que les PPGL sont majoritairement non-métastatiques, 10-15% d'entre eux et jusqu'à 40% selon certains auteurs, développent un profil métastatique défini par la présence d'une tumeur dans un tissu originellement exempt de cellules chromaffines (Ayala-Ramirez et al., 2011; Baudin et al., 2014; Pacak & Wimalawansa, 2015). Cette estimation est régulièrement revue à la hausse, reflétant la difficulté à diagnostiquer le PPGL métastatique et à comprendre les mécanismes de cette transformation maligne. Ce diagnostic est pourtant déterminant puisque la survie du patient à 5 ans est alors évaluée à 50% (Lenders et al., 2014). Par conséquent, les patients atteints d'un PPGL font l'objet d'un suivi à vie, la latence des métastases pouvant être de 20 ans ou plus.

Des caractéristiques cliniques, histologiques et génétiques ont été associées aux métastases sans que l'un de ces indicateurs ne corrèle individuellement de manière satisfaisante. Le défi actuel est donc d'établir un système d'évaluation hautement spécifique de la prédiction du potentiel métastatique du PPGL via la combinaison des facteurs d'influence. De nombreux scores, le « *pheochromocytoma of the adrenal gland scaled Score* » (PASS) (Thompson, 2002), le « *grading system of adrenal pheochromocytoma and paraganglioma* » (GAPP) (Kimura et al., 2014), le GAPP modifié (*modified-GAPP*, M-GAPP) (Koh et al., 2017), le « *age, size, extra-adrenal location, secretory type* » (ASES) (Cho et al., 2018), ou encore le « *composite pheochromocytoma/paraganglioma prognostic* » (COPP) (Pierre et al., 2019), ont ainsi été développés. En outre, il a également été démontré que la prise en compte de la perte immunohistochimique de la sous-unité B de la succinate déshydrogénase (*succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B*, SDHB) améliore significativement le diagnostic du PPGL métastatique (Koh et al., 2017). En effet, la présence d'une mutation germinale de la SDHB est un facteur de risque bien établi car 47% des patients présentant cette altération

développent des métastases (Crona et al., 2019). Toutefois, les indicateurs évalués sont trop nombreux, complexes, pour la plupart non spécifique au PPGL ou que ces derniers ne sont pas toujours accessibles et disponibles dans la pratique clinique (Koh et al., 2017; Pierre et al., 2019).

Certaines données de la littérature rapportent une corrélation entre le phénotype sécrétoire de la tumeur et le potentiel métastatique de celle-ci. Il a notamment été démontré, après normalisation de l'excrétion urinaire de catécholamines par unité de volume tumoral, que les PPGL métastatiques présentent des taux d'adrénaline inférieurs aux autres métabolites (Ayala-Ramirez et al., 2011). En parallèle, des niveaux plus élevés de noradrénaline, de dopamine et de son enzyme de conversion, la DOPA décarboxylase, ont été rapportés dans les cas métastatiques de PPGL et associés à un intervalle de temps sans métastases significativement plus court (Van Der Harst et al., 2002). De façon intéressante, la mesure des taux plasmatiques de 3-méthoxytyramine, le métabolite O-méthylé de la dopamine, s'est avérée 4,7 fois plus élevée chez les patients atteints de PPGL métastatiques que chez les patients sans métastases (Eisenhofer et al., 2012). Cette augmentation est associée aux mutations SDHB et aux tumeurs extra-surréaliennes mais également présente chez les PPGL présentant des métastases sans ces altérations. Ainsi, à l'heure actuelle, seule l'invasion des tissus par la tumeur et la présence de lésions métastatiques, généralement localisées dans les os, les poumons, le foie et les ganglions lymphatiques sont compatibles avec le diagnostic d'un PPGL métastatique (P. F. Plouin et al., 2016).

#### 2.2.6. Traitements du PPGL

Actuellement, l'exérèse chirurgicale est la seule modalité thérapeutique potentiellement curative du PPGL, l'objectif étant de réaliser une résection chirurgicale complète de la tumeur primaire et des structures adjacentes infiltrées si nécessaire. Une surrénalectomie par laparoscopie, moins coûteuse, moins invasive et permettant un rétablissement plus prompt du patient, peut être proposée lorsque le PCC mesure moins de 6 cm (Heger et al., 2017). Cette méthode peut également être indiquée pour les PGL de petite taille, non invasifs et dans des localisations favorables (Lenders et al., 2014).

Ainsi, les diagnostics clinique et biochimique, couplés à des examens d'imagerie médicale, sont essentiels à une planification préopératoire soignée permettant le choix de la technique chirurgicale appropriée et la prévention d'évènements indésirables. En effet, cette exérèse met en lumière de grands défis péri-opératoires. Notamment, l'anesthésie, la manipulation de la

tumeur ou encore la veinographie ou artériographie surrenalienne avec contraste ionique peuvent générer une sécrétion massive de catécholamines et entraîner des complications cardiovasculaires potentiellement mortelles (Bessell-Browne & O'Malley, 2007). Ont été ainsi rapportés, des crises hypertensives, arythmies cardiaques, infarctus du myocarde ou encore des défaillances multi-organes (P.-F. Plouin et al., 2001; Siddik-Sayyid et al., 2007). De ce fait, un suivi et un traitement préopératoire de 7 à 14 jours est recommandé. En première intention, une administration d'antihypertenseurs comme la phénoxybenzamine ou la doxazosine, des bloqueurs de récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques, est décrite (Kocak et al., 2002; Malec et al., 2017). Des inhibiteurs des canaux calciques peuvent être ajoutés en deuxième intention pour améliorer davantage le contrôle de la pression artérielle (Garg et al., 2011). De plus, l' $\alpha$ -méthyl-L-Tyrosine (métyrosine), un réducteur de la production des catécholamines via l'inhibition de la TH, peut être prescrit en combinaison des bloqueurs des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques (Wachtel et al., 2015). Une tachycardie induite par l'hypersécrétion de catécholamines ou par les bloqueurs des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques, peut être traitée par des antagonistes des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Weingarten et al., 2017). Un suivi post-opératoire est également essentiel, la réduction drastique des catécholamines après résection pouvant être à l'origine d'une hypotension sévère. Finalement, des tests biochimiques réguliers, par la mesure des taux plasmatiques ou urinaires de métanéphrines, sont réalisés afin de diagnostiquer une récurrence de la maladie ou la présence de métastases. Ainsi, les avancées technologiques majeures de ces dernières décennies en anesthésiologie et en chirurgie couplées à une prise en charge péri-opératoire du patient ont permis de réduire drastiquement les taux de mortalité pour une résection d'un PPGL, passant de 40% à moins de 3% (Buitenwerf et al., 2020).

Toutefois la chirurgie n'est pas toujours envisageable comme première option, un développement tumoral pouvant empiéter sur les structures adjacentes qui peuvent entraîner des complications potentiellement graves si elles sont éliminées. Dans ce cas, des traitements de radiothérapie conventionnelles dont la MIBG ou de la radiothérapie ciblée, dirigée vers les SSTR ont été développées. Pour les patients atteints de PPGL métastatique, les chimiothérapies basées sur l'administration combinée de la cyclophosphamide, la vincristine et la dacarbazine (CVD) ont montré des taux de réponse allant jusqu'à 40% (Niemeijer et al., 2014). Une alternative orale à la dacarbazine intraveineuse est le témozolomide un agent alkylant ayant démontré son efficacité qui est liée à l'inhibition épigénétique du gène MGMT dans les tumeurs SDHB (Hadoux et al., 2014; Tong et al., 2020). D'autres chimiothérapies telles que le



cisplatine, le 5-fluorouracil ou encore le méthotrexate ont été proposées mais se sont montrées également peu concluantes ou à confirmer (Ilanchezhian et al., 2020; Jimenez et al., 2013).

Ainsi, une prise en charge réussie du PPGL nécessite une approche interdisciplinaire et doit prendre en compte le statut génétique du patient. En effet, chez l'être humain, le PPGL est la tumeur la plus héritable (Dahia, 2014). La caractérisation de cette composante génétique majeure et la corrélation d'un phénotype à son génotype permet une utilisation personnalisée des modalités d'imagerie fonctionnelle et de prise en charge.

### 2.2.7. Génétique du PPGL

#### 2.2.7.1. Retour sur le cas de Minna Roll

Le cas de Minna Roll, premier phéochromocytome examiné, fut riche en enseignement tant les descriptions cliniques et morphologiques rapportées étaient précises. Néanmoins, Fränkel et ses collègues n'ont jamais considéré une composante génétique jugeant qu'elle ne souffrait « d'aucune maladie héréditaire » (Frankel, 1984). Sa famille, fut également décrite « en bonne santé ». Son jeune âge au moment du diagnostic et sa maladie bilatérale dans des organes appariés sont pourtant des signaux cliniques majeurs d'une détermination génétique. Et ce n'est qu'un siècle plus tard, après traduction de l'article originellement en allemand, que la prédisposition héréditaire de ce premier cas a été reconsidérée.

Pour cela, Neumann et son équipe ont réalisé une vaste enquête basée sur l'analyse génétique des descendants de Minna Roll (Neumann et al., 2007). Sur la base des informations réunies, six descendants porteurs de PCC et trois cas de carcinomes thyroïdiens médullaires ont été identifiés. Des mutations des gènes de susceptibilité du PCC *Von Hippel-Lindau* (VHL), *rearranged during transfection* (RET), *neurofibromin 1* (NF1), SDHB et SDHD ont par la suite été recherchés révélant ainsi l'existence chez cette famille d'une mutation germinale du gène RET, à l'origine d'une néoplasie endocrinienne de type 2 (NEM2). Cette maladie héréditaire se caractérise par l'association de carcinomes thyroïdiens et parathyroïdiens et de phéochromocytomes. D'ailleurs, un « élargissement considérable » de la thyroïde avait aussi été décrit lors de l'examen de Minna Roll (Frankel, 1984).

#### 2.2.7.2. Formes sporadiques et familiales du PPGL

Le PCC se distingue par un fort déterminisme génétique où près de 40% des cas sont associés à des syndromes héréditaires et mutations germinales tels que la NEM2, le syndrome de Von Hippel-Lindau (mutation du gène VHL) et la neurofibromatose 1 (mutation du gène NF1)

(Tableau 3) (Favier et al., 2015). De plus, les syndromes PGL1-5, associés à des mutations des gènes codant pour les sous-unités de la succinate déshydrogénase (SDHx : D, AF2, C, B et A respectivement) ont été identifiés.

*Tableau 3 Gènes et maladies associées au PPGL*

Le taux de mutation est le pourcentage de patients atteints de PPGL présentant des mutations du gène concerné. D'après (Favier et al., 2015).

Maladie (code MIM)	Gènes	Taux de mutation (%)*
Neurofibromatose de type 1 (162200)	NF1	3
Néoplasie endocrinienne multiple de type 2 (171400, 162300)	RET	6
Maladie de von Hippel-Lindau (193300)	VHL	7
Parangliomes héréditaires (115310 168000 605373 614165 601650)	SDHx : SDHB SDHD SDHC SDHA SDHAF2	10 9 1 <1 <0.1
Phéochromocytomes familiaux (613403, 154950)	TMEM127 MAX	1 1
Parangliome avec polycythémie (603349)	EPAS1	1
Léiomyomatose et cancer des cellules rénales (150800)	FH	1

Une meilleure compréhension de la génétique du PPGL a été rendue possible grâce aux progrès considérables des techniques d'études génomiques somatiques et germinales. En particulier, l'inspection approfondie de cohortes de patients PPGL, dont l'ADN leucocytaire et les tissus tumoraux ont été collectés, a permis la génération de données génomiques, épigénomiques, transcriptomiques et protéomiques, appariées avec leurs données cliniques. Ces travaux sont à l'origine de connaissances avancées et notamment la mise en évidence de plus de 20 gènes de prédisposition améliorant ainsi la prise en charge des patients porteurs d'un PPGL et ses apparentés. Notamment, après une classification non supervisée des PPGL sur la base de données transcriptomiques, ces derniers semblent se ségréger selon leur génotype, et sont associés à une signature moléculaire spécifique. Trois clusters, présentant des propriétés de localisation, progression et sécrétion tumorales distinctes ont ainsi pu être identifiés en fonction des mutations germinales ou somatiques sous-jacentes (Burnichon et al., 2011). Ainsi, un premier cluster dit « pseudo-hypoxique » (25% des cas de PPGL), un deuxième lié à la signalisation des kinases (55%) et finalement un troisième associé à la voie *wingless integration site* (Wnt) (20%) ont été définis (Fishbein et al., 2017).

### 2.2.7.3. Clusterisation génétique du PPGL

Dans les cellules chromaffines, un état d'hypoxie, correspondant à une inadéquation entre les besoins et des apports réduits et insuffisants en oxygène, est détecté et notamment corrigé par le facteur inductible à l'hypoxie (*hypoxia induced factor*, HIF). Ce facteur de transcription régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'angiogenèse, le métabolisme du glucose, la prolifération ou encore la survie cellulaire (Semenza, 2001). En normoxie, cette réponse est finement contrôlée par la dégradation du facteur HIF à la suite de son hydroxylation par des prolylhydroxylases (prolylhydroxylases domain proteins, PHD) permettant sa reconnaissance par pVHL, son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome (V. Haase, 2009).

Des variants pathogènes des gènes HIF2A codant pour la protéine HIF-2 $\alpha$ , les prolyl hydroxylase-1 et 2 de la famille Egl-9 (*egl-9 family hypoxia inducible factor 1/2*, EGLN1/2) codant pour PHD1 et PDH2 et VHL codant pour la protéine pVHL, sont à l'origine d'une stabilisation du facteur HIF. Ainsi, indépendamment du taux d'oxygène cellulaire, des voies de signalisation associées sont induites engendrant ainsi un phénotype pro-tumoral et métastatique (Fishbein et al., 2017; Jochmanova & Pacak, 2018). Il a récemment été proposé d'ajouter la protéine régulatrice du fer (*iron regulatory protein*, IRP) à ce sous-type génétique (Alrezk et al., 2018).

Ce premier cluster est également associé à des altérations des gènes dont les protéines sont impliquées dans la chaîne respiratoire mitochondriale tels que les SDHx, SDHAF2, la fumarate hydroxylase (FH), la malate déshydrogénase (MDH2), l'aspartate aminotransférase mitochondriale (*glutamate oxaloacetate transaminase 2*, GOT2), le transporteur mitochondrial d'oxoglutarate (*solute carrier family 25 member 11*, SLC25A11), la dihydrolipoamide S-succinyltransférase (DLST) ou encore l'isocitrate déshydrogénase 1 et 2 (IDH1/2) (Favier et al., 2015; Fishbein & Nathanson, 2012; Taïeb et al., 2019). Des études sont en cours pour considérer le gène *succinate-CoA ligase GDP-forming subunit beta* (SUCLG2), codant pour la sous-unité  $\beta$  de la succinate-CoA ligase, comme nouveau gène de susceptibilité du PPGL (Hadrava Vanova et al., 2022). Ces altérations géniques perturbent le cycle de Krebs, altèrent la phosphorylation oxydative mitochondriale conduisant notamment à l'accumulation de succinate, de fumarate et de 2-hydroxyglutarate. Ces précurseurs de cette voie métabolique agissent comme des oncométabolites notamment via l'inhibition compétitive de l'activité des

PHD. *In fine*, HIF-2 $\alpha$  est moins hydroxylé, moins dégradé et ainsi, il s'accumule (Jochmanova et al., 2013; Shankavaram et al., 2013).

Un deuxième cluster est associé à une suractivation des voies de signalisation tyrosines kinases (TK) (Burnichon et al., 2011; Crona et al., 2019; Fishbein et al., 2017). Celui-ci comporte des altérations pour les gènes codant le suppresseur de tumeur NF1, le proto-oncogène RET, la protéine transmembranaire 127 (TMEM127), *myc-associated factor X* (MAX), HRAS et le *fibroblast growth factor receptor 1* (FGFR1) (Castro-Vega et al., 2015; Welander et al., 2018). En outre, de rares cas d'altérations des gènes codant pour les récepteurs à TK MET, Mer (MERTK) et Braf ou encore le *nerve growth factor receptor* (NGFR) et la *kinesin family member 1B* (KIF1B) sont également rapportés (Toledo et al., 2016). Ces mutations sont associées à une suractivation des voies *phosphatidylinositol-3-kinase* (PI3K) / serine threonine kinase 1 (Akt), *mammalian target of rapamycin* (mTORC1) / *p70S6 kinase* (p70S6K) et Ras/Raf/ *extracellular signal-regulated kinase* (Erf) conduisant à l'induction de la prolifération, l'angiogenèse ainsi que la survie et la croissance cellulaire (Crona et al., 2019; Fishbein et al., 2017).

Contrairement aux deux premiers clusters, le troisième cluster est encore peu exploré mais semble impliquer la signalisation Wnt et Hedgehog (Fishbein et al., 2017). Celui-ci, exclusivement somatique, répertorie les fusions de gène *mastermind-like transcriptional coactivator 3* (MAML3) ainsi que des altérations du gène *cold shock domain-containing E1* (CSDE1) à l'origine d'une suractivation de ces voies et de la  $\beta$ -caténine, une cible de ces dernières (Guo et al., 2020). Ainsi, il en résulte un phénotype plus agressif caractérisé notamment par une augmentation de la prolifération, l'angiogenèse, l'apoptose, et la dérégulation du métabolisme (Morimoto et al., 2022). Finalement, un quatrième cluster mixte cortical moins bien caractérisé pourrait inclure une partie des tumeurs MAX (Fishbein et al., 2017).

#### 2.2.7.4. Impact de la génétique sur la présentation du PPGL

L'étude de cette taxonomie moléculaire propre au PPGL est décisive pour une prise en charge et une médecine personnalisées des patients. Notamment, le cluster 1 est associé à un risque élevé de métastases (24%) en raison de la grande proportion des mutations SDHB en son sein (Crona et al., 2019). Le risque de développement métastatique pour les PPGL du cluster 3 s'élève à 11,4% alors qu'il est de l'ordre de 4,1% pour le cluster 2. La génétique du PPGL est également considérée pour la sélection des modalités de suivi du patient après résection

(Fagundes & Almeida, 2022). En effet, tandis que les PPGL du cluster 2 sont essentiellement surrenaliens, ceux du cluster 1 pseudo-hypoxiques sont généralement extra-surrenaliens (Figure 15) (Gimenez-Roqueplo et al., 2003). Les recommandations incluent également un suivi biochimique adapté aux spécificités de chaque cluster.

De façon très intéressante, les PPGL « pseudo-hypoxiques » appartenant au cluster 1 sont majoritairement noradrénergiques ou dopaminergiques (Figure 15). Ce phénotype sécrétoire résulte de l'inhibition, par HIF-2 $\alpha$ , de l'expression de la PNMT induite par les glucocorticoïdes. De plus, une proportion notable de PPGL chez les porteurs d'une mutation SDHx semble également présenter un déficit pour la DBH, l'enzyme de conversion de la dopamine en noradrénaline. Ainsi, les patients atteints de ces tumeurs présentent une production accrue de la 3-méthoxytyramine, le métabolite de la dopamine (Eisenhofer et al., 2011, 2017). Contrairement au cluster 1, les PPGL du cluster 2 sont généralement adrénérgiques et présentent une expression plus élevée de la PNMT. Ces deux sous-groupes se distinguent également par une dynamique de sécrétion de catécholamines différente. En effet, les PPGL du cluster 1 se caractérisent par des contenus en catécholamines plus faibles mais avec des taux plus élevés de sécrétion par masse de tissu tumoral que les tumeurs du cluster 2 (Eisenhofer et al., 2010). En effet, il a été montré que 35% des niveaux de catécholamines des PCC VHL sont sécrétés dans le plasma chaque jour, contrairement à seulement 1,8% pour les MEN2 (Eisenhofer et al., 2008). Il a également été mis en évidence une sous-expression de gènes clés de la VSR dont SNAP25, STX et le gène codant la rabphiline 3A (RPH3A) dans les PCC porteurs de mutations VHL par rapport à ceux porteurs de variants pathogènes RET, suggérant une VSR plus mature pour ces derniers. Ainsi, le contrôle de la sécrétion semble moins développé dans les tumeurs du cluster 1. En conséquence, le niveau basal de sécrétion des catécholamines est 20 fois plus élevé chez ces tumeurs VHL que chez les MEN2, ce qui explique l'hypertension soutenue observée chez ces patients (Eisenhofer et al., 2008). Ces altérations de la machinerie moléculaire qui sous-tend l'exocytose des catécholamines peuvent également expliquer la nature plus paroxystique des symptômes observés chez les patients NEM2 par rapport à ceux atteints du syndrome VHL, la sécrétion étant toujours limitée par l'expression de nombreux composants de la VSR. Il en est de même pour les patients atteints d'une mutation NF1 qui sont souvent asymptomatiques et normotendus (Képénékian et al., 2016). Le phénotype de sécrétion des PPGL du cluster Wnt n'a pas encore été étudié bien qu'une expression exacerbée de la CgA ait été décrite (Fishbein et al., 2017).

La mise en évidence de caractéristiques moléculaires distinctes entre les différents clusters est également exploitée dans le développement d'approches thérapeutiques personnalisées (Figure 15). Notamment pour le cluster 1, l'accumulation d'oncométabolites tels que le succinate, le fumarate ou encore le 2-hydroxyglutarate dans les tumeurs peut les rendre sensibles au ciblage avec des inhibiteurs de la poly-(ADP)-ribose polymérase (PARP) (Pang et al., 2018; Sulkowski et al., 2020). À ce sujet, un essai clinique de phase II est en cours afin de déterminer si l'association de l'inhibiteur de PARP l'olaparib et du témozolomide est plus efficace que ce dernier en monothérapie (NCT04394858). De plus, l'environnement tumoral pseudohypoxique des PPGL du groupe 1 peut promouvoir l'échappement immunitaire. Par conséquent, des essais de phase II sont en cours pour évaluer l'efficacité des immunothérapies, notamment le pembrolizumab (NCT02721732). L'environnement pseudohypoxique favorisant également la régulation positive des facteurs de croissance vasculaires, le PPGL exprime préférentiellement des facteurs angiogéniques comme le VEGF (Ferreira et al., 2014). Ainsi, les inhibiteurs de la TK jouent un rôle potentiel dans la prise en charge du PPGL métastatique. L'efficacité du sunitinib et du sorafenib, des composés anti-angiogéniques a été démontré *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de xénogreffes chez le rat (Denorme et al., 2014). À ce sujet, l'essai randomisé FIRSTMAPPP de phase II (NCT01371201) promu par Gustave Roussy, démontre un intérêt majeur du sunitinib pour le traitement du PPGL métastatique. Finalement, des essais de phase II évaluant l'efficacité des antagonistes d'HIF-2 $\alpha$  tel que le Belzutifan (NCT04924075) sont également en cours.

Le cluster 2 étant généralement caractérisé par une régulation positive des voies de signalisations Ras/Raf/Erk ou PI3K/Akt/mTOR1, des études portant sur l'évaluation de l'administration d'inhibiteurs de mTOR sont en cours (Figure 15). Notamment, l'essai en phase II portant sur le bénéfice de l'évérolimus dans les tumeurs neuroendocrines a démontré une efficacité modeste chez les patients PPGL métastatiques (Oh et al., 2012). De plus, l'inhibition de la signalisation MAPK à l'aide d'inhibiteurs de la protéine kinase a démontré son efficacité dans le traitement des tumeurs métastatiques chez les enfants porteurs de mutations NF1, ce qui soulève la possibilité de son utilisation thérapeutique dans les PPGL présentant ces mutations (Dombi et al., 2016).

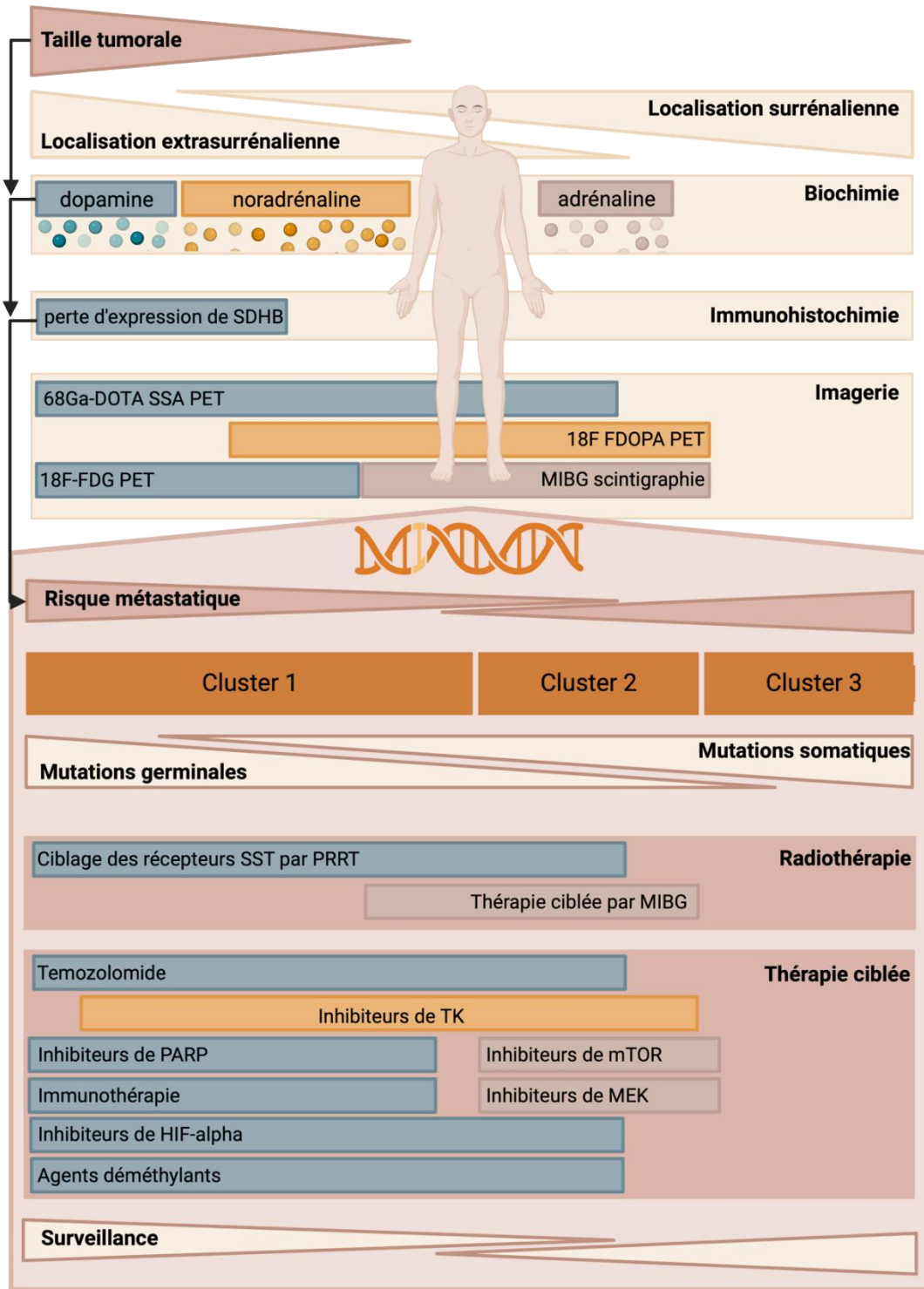


Figure 15 Stratégie personnalisée basée sur la classification moléculaire pour les patients atteints de PPGL

Les PPGL du cluster 1 pseudo-hypoxique, et en particulier les porteurs de la mutation SDHx, sont associés à un phénotype dopaminergique ou noradrénergique reflétant la faible différenciation des cellules paraganglionnaires. La localisation extra-surrénaliennne et la taille importante de la tumeur au moment du diagnostic peuvent prédire une mutation germinale du gène SDHx, tandis que la localisation surrénaliennne peut indiquer une mutation du cluster 2. Des symptômes épisodiques ou un nombre élevé de symptômes (tremblements, pâleur, anxiété) sont évocateurs d'un PPGL du cluster 2. Ces tumeurs présentent un phénotype sécrétoire mixte ou principalement adrénénergique, conséquence d'une différenciation cellulaire plus avancée et d'une expression accrue de la phényléthanolamine N-méthyltransférase (PNMT). Le risque métastatique pour les PPGL de cluster 1, 2 et 3 est

de 24%, 4,1% et 11,4% respectivement. L'immunohistochimie de la SDHB dans le PPGL est un biomarqueur métabolique pertinent, associé à un risque métastatique élevé. Par conséquent, les patients présentant des mutations associées au cluster 1 ont un phénotype d'imagerie moléculaire spécifique qui comprend une avidité réduite ou absente des traceurs impliqués dans la synthèse ou le stockage des catécholamines. La voie de la biosynthèse des catécholamines étant souvent régulée à la hausse chez les patients présentant des mutations de gènes du cluster 2, les traceurs se liant aux transporteurs noradrénergiques (NET) et aux transporteurs vésiculaires de monoamines (VMAT) sont souvent plus sensibles. Ainsi, de nouvelles thérapies ciblées, basées sur la classification moléculaire, sont développées. PARP : poly-(ADP)-ribose polymérase, mTOR1 : *mammalian target of rapamycin 1*, MEK : *mitogen-activated protein kinase kinase* (ou MAP2K), TK : *tyrosine kinase*, MIBG : *metaiodobenzylguanidine*, PRRT : *peptide receptor radionuclide therapy*, SST : *somatostatin*. D'après (Winzeler et al., 2021).

### 2.2.8. Régulation épigénétique et post-transcriptionnelle du PPGL

Alors que la composante génétique est une caractéristique majeure du PPGL, la piste de l'épigénétique, correspondant à des modifications fonctionnelles héréditaires non codées par la séquence de l'ADN, reste encore peu explorée bien qu'elle soit reconnue. Par exemple, une hyperméthylation de l'ADN et des histones est associée au cluster 1 pseudo-hypoxique du PPGL, notamment lors de mutations SDHx ou FH. En effet, outre l'inhibition des PHD, il a été démontré que le succinate et le fumarate inhibent l'activité des enzymes *ten-eleven translocation* (TET) et *Jumonji C domain-containing* (JMJD), des régulateurs clés de l'expression des gènes via la déméthylation des régions promotrices de l'ADN et des histones (Lussey-Lepoutre et al., 2017). Parmi les gènes impactés, certains sont impliqués dans le métabolisme des catécholamines et la VSR dont la PNMT, le gène codant pour le récepteur de la dopamine D2 (*dopamine receptor D2*, DRD2) le gène *solute carrier family 6 member 2* (SLC6A2) codant pour le transporteur noradrénergique (*norepinephrine transporter*, NET) ou encore le neuropeptide Y (NPY) (Letouzé et al., 2013). Cette hyperméthylation, notamment dans le cas de PPGL mutés pour SDHB, joue également un rôle majeur dans l'acquisition d'un phénotype métastatique via l'induction des voies de la TEM (Loriot et al., 2015). Des mutations épigénétiques drivers du PPGL pseudo-hypoxique ont également été mises en évidence avec, par exemple, l'inactivation épigénétique de l'expression de SDHC à la suite d'une hyperméthylation de son promoteur (Richter et al., 2016). De façon intéressante, un phénotype hypométhylé, lié à une instabilité chromosomique et un plus grand nombre d'altérations somatiques du nombre de copies, a été identifié lors de mutations du cluster kinase (Backman et al., 2017; Eden et al., 2003; Letouzé et al., 2013). D'autres altérations épigénétiques ont également été identifiées dans les syndromes PGL1 et PGL2 liés à des altérations des gènes SDHD et SDHAF2 soumis à une empreinte génétique maternelle. Dans ce cas, l'allèle maternel n'étant pas exprimé, seules les mutations héritées du père peuvent causer la maladie (Badenhop et al., 2001).



Enfin, l'implication des ARN dans les régulations épigénétiques et post-transcriptionnelles et ainsi dans la pathogenèse du PPGL a été considérée. La classe des ARN non codant (ncARN) est notamment constituée des ARN long non codants (lncARN), des ARN circulaires (circARN), et des microARN (miARN). Ces derniers sont des régulateurs post-transcriptionnels de l'expression des gènes agissant au niveau de l'ARNm cible. Leur dérégulation aurait ainsi un impact majeur dans la fonction biologique des tumeurs dont le PPGL. Leur implication est d'autant plus avérée que celle-ci s'accompagne également d'une dérégulation de l'expression des autres ncARN. Notamment, la séquestration des miARN par des sites de liaison portés par des lncARN, entraînant leur inhibition, a été observé dans le PPGL. Ainsi, une étude bio-informatique se basant sur les données du programme *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) a permis d'identifier 23 lncARN présentant des interactions avec 6 miARN et 22 ARNm, tous dérégulés dans le PPGL (Liang et al., 2018). Par ailleurs, la surexpression de deux d'entre eux est associée à un mauvais pronostic. De façon intéressante, une étude récemment publiée sur l'analyse du transcriptome des lncARN a révélé une signature moléculaire qui permet de distinguer les sous types de PPGL (Job et al., 2020). Yu *et al.*, sont les seuls, à ce jour, à avoir examiné le profil d'expression des circARN dans le PPGL, suggérant leur implication dans la régulation des processus de méthylation des histones et mettant ainsi en évidence leur rôle de biomarqueurs potentiels du PPGL (Yu et al., 2020).

### 3. Les microARN, des régulateurs internes de l'homéostasie

#### 3.1. Les miARN, acteurs de l'évolution

Les miARN sont des petits ARN non codants d'environ 22 nt qui affinent l'expression génique au niveau post-transcriptionnel. Cette régulation inhibitrice correspond à une liaison, d'une séquence dite « seed » de 6 nt à l'extrémité 5' du miARN, majoritairement dans la région 3' non traduite (*untranslated region*, UTR) des ARNm cibles. Cette interaction, généralement imparfaite, induit le clivage, la dégradation de ces derniers et/ou leur répression traductionnelle (Bartel, 2018).

Le premier miARN, découvert chez *C. elegans* en 1993, a été initialement considéré comme une singularité de cet organisme modèle (R. C. Lee et al., 1993). Ce n'est qu'après la découverte d'un deuxième miARN, quelques années plus tard, conservé chez de nombreuses espèces dont l'être humain, qu'une prise de conscience quant à leur généralité dans le règne animal a pu se produire forçant ainsi les scientifiques à « réorganiser [leur] vision de l'univers » (Ambros, 2008; Pasquinelli et al., 2000). Trente ans plus tard, quelques 38 589 précurseurs et 48 860 miARN matures, décrits chez 271 organismes, sont répertoriés dans miRBase (Kozomara et al., 2019; Kozomara & Griffiths-Jones, 2014). Cette base de données (*data base*, DB) publique, collectant notamment les données de séquençage à haut débit des petits ARN, répertorie actuellement (v.22.1) 1 917 pré-miARN et 2 654 miARN matures chez l'être humain. Ainsi, la régulation de l'expression des gènes par les miARN, retrouvés chez les animaux, les plantes, les champignons mais également chez les virus, apparaît comme une caractéristique cellulaire ancestrale. D'une manière saisissante, la machinerie protéique associée aux miARN est non seulement très conservée, mais de nombreux miARN matures le sont également, sur de grandes distances phylogénétiques (Bråte et al., 2018; Filippov et al., 2000; Lagos-Quintana et al., 2001; Moran et al., 2017). Notamment, plus de 30 miARN sont communs à tous les bilatériens et des centaines d'autres sont conservés au sein de clades spécifiques (Prochnik et al., 2007). Par ailleurs, cette conservation est un critère couramment utilisé pour identifier les gènes de miARN homologues (S.-C. Li et al., 2010).

Une pression évolutive est également opérée pour maintenir les sites complémentaires des miARN dans la région 3'UTR des ARNm cibles. Par exemple, les gènes dont les sites cibles ne sont pas conservés ont tendance à être exprimés dans les tissus dépourvus du miARN correspondant (Farh et al., 2005). Au contraire, les sites cibles conservés se trouvent préférentiellement dans les gènes coexprimés avec leurs miARN. À titre d'exemple, ce sont

plus de 45 000 sites au niveau 3'UTR des ARNm qui sont maintenus de manière sélective grâce au ciblage des miARN chez l'être humain (Friedman et al., 2009). Les sites cibles des miARN sont également conservés entre différentes espèces suggérant que de mêmes miARN conservés régulent des processus biologiques similaires (C.-T. Lee et al., 2007).

L'apparition et l'évolution des organismes multicellulaires semblent résulter de l'acquisition de nouvelles fonctions des gènes paralogues générés au cours de duplications segmentales et/ou du génome entier et la ségrégation de ces mécanismes entre différents types cellulaires (Holland et al., 1994). Cela semble également correspondre à l'apparition des voies des miARN pour la régulation de l'expression des gènes (C.-T. Lee et al., 2007). Dans ce contexte, Peterson et son équipe ont démontré que l'augmentation de cette complexité ne corrèle pas avec le nombre de paralogues de miARN, qui suit le nombre de duplications du génome entier, mais avec l'acquisition de nouvelles séquences seed de ces derniers (Peterson et al., 2022). Ainsi, de manière remarquable, la sophistication au cours de l'évolution corrèle avec la création de nouvelles familles de miARN, qui partagent une même séquence seed, et repose ainsi sur l'élaboration et la conservation de mécanismes de régulation génique. Il est toutefois important de souligner que l'utilisation du terme « famille » ne fait pas indubitablement référence à un ancêtre commun.

### 3.2. Les miARN, des régulateurs de l'homéostasie

En raison de la petite taille des miARN et de leur séquence seed, des sites régulateurs appariés peuvent facilement émerger dans les régions 3'UTR (Farh et al., 2005; Stark et al., 2005). À cet égard, 400 cibles sont en moyennes conservées par famille de miARN (Friedman et al., 2009). Ainsi, la couche dense de contrôle post-transcriptionnel ajoutée par les miARN, complète et étend la régulation se produisant à d'autres niveaux du programme d'expression de plus de 60% des gènes codant les protéines. Un miARN peut moduler de la sorte des centaines de transcrits d'ARN (Baek et al., 2008). Dans certains cas, il cible plusieurs fois le même 3'UTR entraînant ainsi une répression plus importante, chaque site supplémentaire aura tendance à agir de manière additive. Cette répression sera d'autant plus importante si ces sites, agissant alors de manière coopérative, sont situés à environ 8-40 nt les uns des autres (Grimson et al., 2007; Sætrom et al., 2007). De la même manière, chaque ARNm ciblé peut être régulé par des dizaines de miARN (Friedman et al., 2009). De façon intéressante, un 3'UTR ayant un site préférentiellement conservé pour une famille de miARN aura généralement des sites conservés pour d'autres familles de miARN, en moyenne 4 à 5. Ainsi, il est possible de considérer les

miARN comme des stabilisateurs de l'expression du génome qui permettent d'établir un seuil d'activation des fonctions des gènes (Posadas & Carthew, 2014). Toutefois, la répression exercée pour chaque site est généralement modeste, souvent inférieure à 20% (Baek et al., 2008; Selbach et al., 2008). Ainsi, la majorité des cibles, faiblement réprimées, ne constitueraient qu'un bruit de fond à côté desquelles, quelques cibles, probablement moins de 10, seraient fortement inhibées par des miARN et alors décrits comme des drivers phénotypiques (Ecsedi et al., 2015; Pinzón et al., 2017). Plutôt que de s'exclure mutuellement, ces deux concepts pourraient coexister au sein des systèmes biologiques. Il semble ainsi difficile qu'un processus biologique puisse échapper à l'influence de ce réseau complexe de régulation. À ce sujet, il est désormais avéré que l'ensemble des organismes multicellulaires eucaryotes recourent aux miARN pour réguler les fonctions cellulaires fondamentales telles que la prolifération, le métabolisme, la différenciation ou encore l'apoptose, faisant d'eux des régulateurs fins de l'homéostasie (Hwang & Mendell, 2006).

Remarquablement, les miARN sont également impliqués dans la communication intercellulaire. Bien que l'origine de leur présence ne soit pas totalement élucidée, des miARN extracellulaires sont détectés dans la circulation sanguine et d'autres fluides biologiques tels que l'urine, les larmes, la salive, le lait maternel ou encore le liquide céphalorachidien et peuvent alors servir de biomarqueurs de diverses pathologies telles que les cancers (Weber et al., 2010). Ces miARN, libérés en réponse à un stress par une cellule lésée par exemple, sont capables d'agir à distance modulant ainsi la réponse des cellules environnantes. C'est notamment le cas des cellules neuroendocrines dont les cellules chromaffines qui, en réponse à un stimuli neuronal, ont la capacité de sécréter des miARN agissant alors comme des hormones (Gümürdü et al., 2017). Alors qu'ils sont retrouvés majoritairement sous une forme libre (>90%), les miARN circulants peuvent également circuler dans le plasma et le sérum encapsulés dans des microvésicules, des exosomes ou encore des corps apoptotiques (Iftikhar & Carney, 2016). Le rôle des miARN extracellulaires demeure difficile à saisir. Ils exerceraient une régulation des gènes dans des cellules cibles après leur endocytose au sein de celles-ci (Y. Park, 2017). De plus, leur implication dans la signalisation cellulaire par le biais d'activation de récepteurs est également évoquée.

*In fine*, les miARN sont des orchestres subtils de l'harmonie de l'expression des gènes au niveau microscopique. Leur influence spectaculaire à l'échelle macroscopique modèle ainsi le cours de la vie.

### 3.3. Biogenèse des miARN

#### 3.3.1. Transcription des miARN

Les miARN canoniques, bien caractérisés, sont généralement transcrits à partir de régions intragéniques, majoritairement introniques (Y.-K. Kim & Kim, 2007; The FANTOM Consortium et al., 2017). Sous le contrôle du même promoteur, les miARN sont alors soumis à la même régulation transcriptionnelle que ces derniers (Baskerville & Bartel, 2005). A ce sujet, de nombreux profils d'expression fortement corrélés ont été observés entre les miARN et leurs gènes hôtes. De plus, certains miARN sont également codés à partir d'exons et présentent alors un recouvrement avec des unités de transcription (Rodriguez et al., 2004).

La transcription des miARN s'opère par une ARN polymérase II pour produire un transcrit primaire de plusieurs kilobases appelé pri-miARN (Y. Lee et al., 2004). Dans certains cas particuliers, une transcription par une ARN polymérase III a pu être décrite (Borchert et al., 2006). Le pri-miARN généré est constitué d'une ou plusieurs structures en boucles contenant un ou plusieurs miARN souvent apparentés (Denli et al., 2004). Ces miARN, alors dit polycistroniques, sont situés à moins de 50 kb les uns des autres et ont des profils d'expression fortement corrélés bien que ces derniers puissent différer par des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle (Baskerville & Bartel, 2005; Y. Lee, 2002; Sempere et al., 2004).

Le pri-miR se structure sous la forme d'une épingle à cheveux avec une tige centrale d'ARN double brin (ARN<sub>db</sub>) flanquée d'une boucle terminale d'un côté et de segments d'ARN monocaténaire (ARN<sub>sb</sub>) de longueurs variables de l'autre, aux extrémités 5' et 3' (X. Zhang & Zeng, 2010). Alors que le pri-miR porte les caractéristiques d'une transcription par la polymérase II avec une coiffe en 5' et une polyadénylation en 3', les éléments qui le distinguent des autres transcrits dans le génome, lui permettant donc d'être reconnu pour sa maturation, sont partiellement connus. Notamment, il a été démontré qu'une longueur optimale de la tige, qui inclut le duplex de miARN, est de 36 +/- 3 nucléotides (nt) (Figure 16) (Han et al., 2006; Nguyen et al., 2015; Roden et al., 2017). Celle-ci peut comporter des renflements ou bulges, correspondant à des bases non appariées, avec toutefois deux régions qui en sont dépourvues, à environ 16-21 nt et 28-32 nt de la base de la tige. Concernant la boucle apicale, une taille de 3 à 23 nt s'est avérée compatible avec la maturation efficace du pri-miARN (L. Adams, 2017; Zeng & Cullen, 2003). Outre ces caractéristiques structurales secondaires, des motifs de la séquence primaires impliqués dans la maturation du pri-miARN, ont été identifiés, notamment la longueur optimale permettant le recrutement de protéines accessoires (Auyeung et al., 2013;

Mori et al., 2014). Par exemple, la présence d'un motif CNNC, se trouvant à environ 17-18 nt en aval du miARN ou encore les motifs UGU ou UGUG au niveau de la boucle apicale et le motif UG à l'extrémité basale sont décrits. Au moins l'un de ces trois motifs est présent dans près de 80% des miARN humains suggérant que d'autres déterminants peuvent également exister.

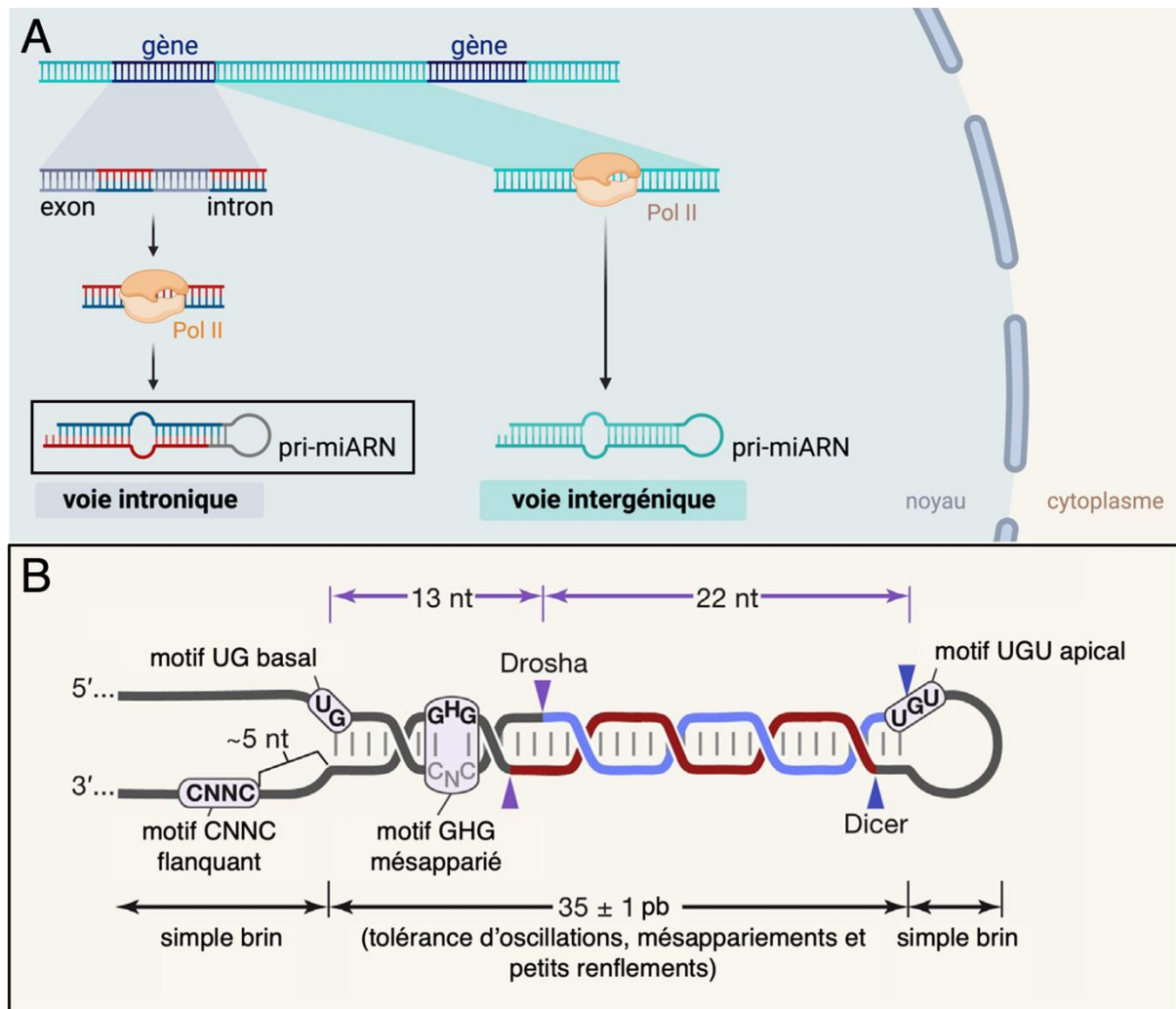


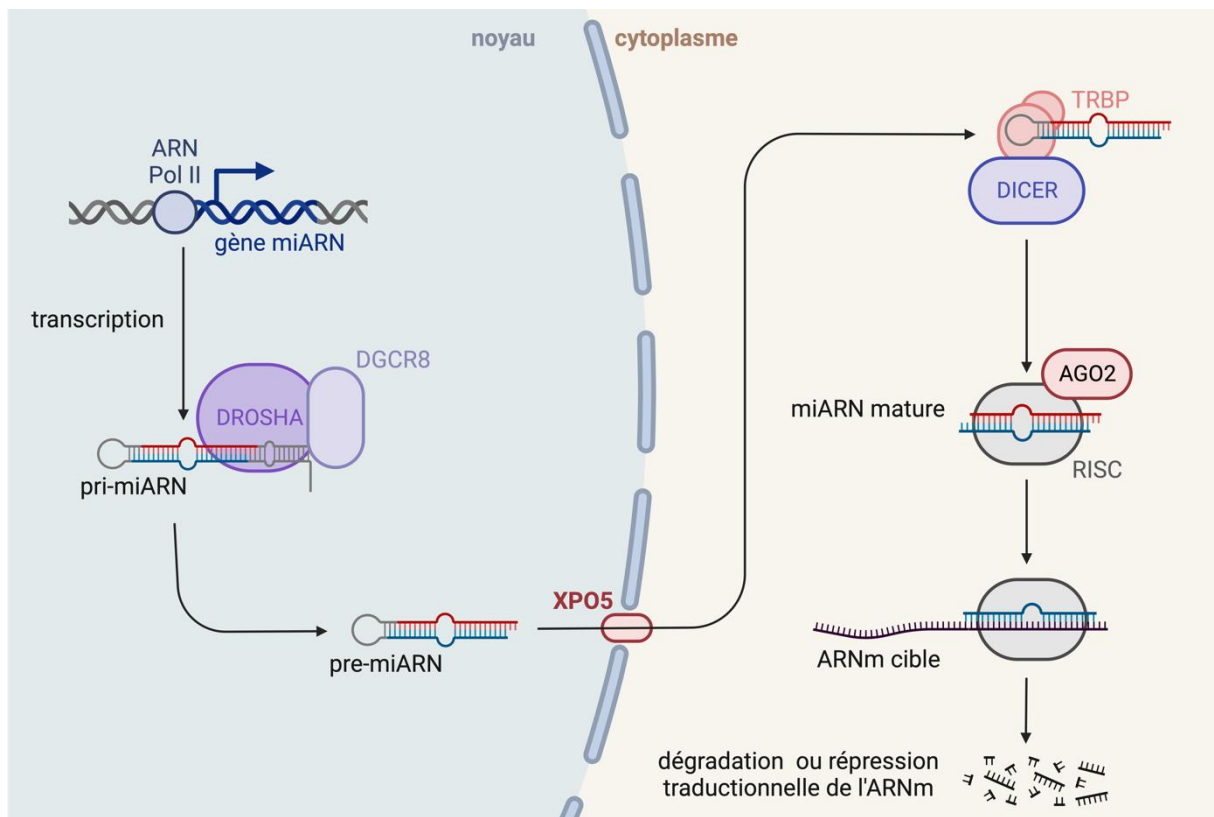
Figure 16 Transcription et caractéristiques structurales du pri-miARN

A) Une fois transcrit par la polymérase II (Pol II), via une voie intronique ou intergénique, le pri-miARN se replie sur lui-même sous la forme d'une épingle à cheveux. B) Les caractéristiques structurales d'une épingle à cheveux de miARN canonique comprennent une tige de 35 paires de bases (pb) avec une boucle et des régions flanquantes non structurées. Drosha reconnaît la base de l'épingle à cheveux tandis que le dimère Dgcr8 reconnaît la région apicale. Les sites de clivage de Drosha sont représentés par des flèches violettes alors que les sites de clivage de Dicer sont représentés par des flèches bleues. Adapté de (Bartel, 2018).

### 3.3.2. Maturation nucléaire des miARN

Après sa transcription, le pri-miARN subit plusieurs étapes de maturation dont une première par le complexe microprocesseur nucléaire (Figure 17) (Bartel, 2018). Ce complexe hétérotrimétrique, contenant une molécule de l'endonucléase Drosha et deux molécules de son

cofacteur *DiGeorge syndrome critical region gene 8* (*Dgcr8*, appelée aussi Pasha chez les invertébrés), reconnaît la structure en épingle à cheveux du pri-miARN et le clive en précurseur-miARN (pré-miARN) d'environ 60 à 70 nt (Y. Lee et al., 2003). À cet égard, ces processeurs, essentiels à la génération de miARN, sont conservés chez les animaux (Grimson et al., 2008). La délétion de Droscha dans une lignée cellulaire humaine abolit totalement la production de miARN canoniques (Y.-K. Kim et al., 2016). De plus, il a été montré chez la souris, que la déficience germinale de Droscha ou de *Dgcr8* entraîne une létalité précoce lors de l'embryogenèse (Bernstein et al., 2003; Chong et al., 2010).



*Figure 17 Biogenèse et fonction des miARN canoniques*

Une fois transcrit par la polymérase II (pol II), le pri-miARN est reconnu et clivé par le microprocesseur pour libérer un pré-miARN. Le pré-miARN est exporté vers le cytoplasme sous l'action de l'exportine (Xpo5) et du Ran-GTP et clivé par Dicer pour produire un duplex de miARN. Un brin du duplex de miARN, le miARN mature (rouge), est chargé dans le complexe miRISC tandis que l'autre brin, le miARN\* ou passager (bleu), est dégradé. Au sein du complexe d'inhibition, les nucléotides 2 à 5 du miARN sont prêts à interagir avec les ARNm cibles et entraîner le clivage, la dégradation ou l'inhibition traductionnelle de ces derniers. *D'après (Bartel, 2018).*

À son extrémité C-terminale, Droscha possède un domaine de liaison à l'ARNdb et deux domaines RNase de type III en tandem qui se dimérisent pour former un centre catalytique agissant spécifiquement sur cet ARNdb (Han et al., 2004). Ainsi, la jonction basale entre l'ARNdb et l'ARNsb sert de référence principale pour déterminer le site de clivage (Auyeung et al., 2013). Il est important de souligner que la reconnaissance de celui-ci doit être précise

puisque'il définit l'extrémité du miARN et détermine donc sa spécificité (Seitz & Zamore, 2006). Ainsi, Drosha clive l'épingle à cheveux à environ 11 pb de cette jonction basale et à environ 22 pb de la jonction apicale liée à la boucle terminale (Han et al., 2006; Zeng et al., 2005). Cette scission est asymétrique et produit, en conséquence, une extrémité libre de deux nucléotides en 3' (Y. Lee et al., 2003). Le domaine de liaison à l'ARNdb de Drosha est nécessaire à l'interaction du substrat mais nécessite une activité supplémentaire fournie par DGCR8 (Gregory et al., 2004). En effet, ce cofacteur essentiel reconnaît également la jonction simple brin et double brin de l'ARN du pri-miARN et stabilise sa liaison avec Drosha (Han et al., 2006; Yeom et al., 2006). La protéine DGCR8 humaine possède deux domaines de liaison à l'ARNdb dans sa région C-terminale qui interagissent avec le domaine central de l'endonucléase.

Des voies non canoniques, généralement indépendantes de Drosha, sont décrites reflétant ainsi la flexibilité évolutive de la biogenèse des miARN. Parmi ces voies, la première identifiée est la production de miRtrons où un analogue de pré-miARN, adoptant une courte structure en tige-boucle, est généré par épissage d'un ARNm (Berezikov et al., 2007). La maturation médiée par Drosha peut également être contournée dans le cas de petits ARN ayant une structure endogène en épingle à cheveux, générés directement par transcription (Babiarz et al., 2008). Bien qu'ils soient majoritairement transcrits par l'ARN polymérase III, certains d'entre eux le sont par la polymérase II (Xie et al., 2013). Finalement, certains de ces petits ARN peuvent également provenir d'autres ARN non codants tels que les ARN de transfert (ARNt) ou les petits ARN nucléolaires (small nucleolar RNA, snoARN) (Babiarz et al., 2008; Ender et al., 2008). Toutefois, chez les vertébrés, ces divers mécanismes alternatifs ne concernent qu'1% des miARN conservés. De plus, la plupart des miARN non canoniques sont peu abondants et peu conservés.

### 3.3.3. Export nucléaire et maturation cytoplasmique des miARN

Le pré-miARN généré s'organise en un ARNdb, replié en épingle à cheveux comportant une extrémité 3' flanquante de deux nucléotides. C'est justement sa structure particulière hélicoïdale (et non sa séquence) qui lui permet d'être exporté vers le cytoplasme par la protéine de transport *exportin 5* (Xpo5) de façon dépendante d'une GTPase nucléaire Ran (*Ran guanosine triphosphatase*, Ran-GTP) (Bohnsack et al., 2004; Yi et al., 2003). Par ailleurs, l'inactivation de Xpo5 entraîne une réduction des niveaux de miARN sans accumulation de pré-miARN nucléaire suggérant qu'elle permet l'export mais également la protection du pré-miARN contre la dégradation dans le noyau. En outre, cette réduction suggère également qu'il



existe des mécanismes alternatifs pour ce transport (Yi et al., 2003). Le complexe trimérique formé migre ainsi vers le cytoplasme au travers du pore nucléaire. Après cette translocation, l'hydrolyse du Ran-GTP en Ran-GDP induit la dislocation du complexe et la libération du pré-miARN dans le cytoplasme. C'est également sa petite structure qui va lui permettre d'être reconnu par l'endonucléase cytosolique Dicer (Hutvagner et al., 2001). À l'inverse de Drosha, de nombreux miARN canoniques sont encore détectés en l'absence de Dicer chez l'être humain, bien qu'à des niveaux nettement réduits (Ha & Kim, 2014; Y.-K. Kim et al., 2016). Ce processeur conserve et précise le pré-miARN pour générer un ARNdb à l'origine des miARN matures et fonctionnels.

Dicer se caractérise par la présence d'un domaine Piwi-Ago-Zwille (PAZ) qui s'organise en deux poches se liant aux extrémités 5' et 3' du pré-miARN (MacRae et al., 2006). Par ailleurs, elles peuvent être occupées simultanément lorsque cet ARNdb présente une extrémité libre de deux nucléotides en 3', ce qui peut en partie expliquer la préférence de Dicer pour cette structure secondaire lors de la reconnaissance de son substrat. À l'instar de Drosha, cette endonucléase possède également, dans son domaine C-terminal, deux domaines RNase de type III organisés en tandem formant un dimère intramoléculaire pour créer un centre catalytique à leur interface (H. Zhang et al., 2004). Selon le modèle actuel, il a été proposé que la région entre les domaines PAZ et RNase III fonctionne comme une règle moléculaire qui détermine précisément le site de clivage du pré-ARNm. Ainsi, des changements de conformation sont opérés pour rendre Dicer active. Notamment, deux domaines hélicases à l'extrémité N-terminale de Dicer, deviennent flexibles lors de son activation et facilitent la reconnaissance et la liaison du pré-miARN au centre catalytique en interagissant avec sa boucle terminale (Y.-Y. Lee et al., 2023). C'est justement près de celle-ci que le pré-miARN va être finalement clivé, à une distance fixe de 22 nt de l'extrémité 3' terminale de l'ARNdb (J.-E. Park et al., 2011; H. Zhang et al., 2004). Cette distance dépend de l'espèce et du type de Dicer impliqué. Finalement, Dicer est accompagnée de sa protéine accessoire de liaison à l'ARN TAR (*TAR RNA-binding protein*, Trbp), qui module l'efficacité de maturation de certains pré-miARN et ajuste la longueur des miARN matures (Chendrimada et al., 2005; Wilson et al., 2015). Toutefois, chez les mammifères, les cofacteurs ne sont pas essentiels à ce processus médié par Dicer (Chakravarthy et al., 2010; H. Y. Lee & Doudna, 2012).

### 3.4. Mécanismes d'action des miARN

#### 3.4.1. Formation du complexe d'inhibition des ARN

Le clivage du pré-miARN en un duplex de miARN, déclenche la programmation du *microRNA RNA-induced silencing complexe* (miRISC), opérateur de l'inhibition de l'expression des gènes. Ce complexe ribonucléoprotéique, formé au cours d'un processus d'assemblage en plusieurs étapes, est notamment composé d'un miARN guide reconnaissant l'ARNm cible et d'une protéine Ago. Cette dernière, effecteur minimal nécessaire au miARN pour exécuter son mécanisme de répression, est composée des domaines N-terminal, PAZ, intermédiaire (middle, MID) et *p-element induced wimpy testis* (PIWI) (Connerty et al., 2015).

Le transfert du duplex de miARN, de Dicer à Ago, initie le processus d'assemblage du complexe miRISC. Ce chargement, nécessitant de l'ATP et le phosphate 5' des miARN, se poursuit par le déroulement du duplex par le domaine PAZ d'Ago qui reconnaît et s'ancre aux extrémités 3' des miARN (Kawamata et al., 2009; Nykänen et al., 2001). La formation de ce pré-miRISC est facilitée par l'ancrage du domaine N-terminal d'Ago entre les brins du duplex et la liaison du domaine MID aux extrémités 5' des miARN. L'un des deux brins, correspondant au miARN guide, se lie au complexe d'inhibition. Le second brin, correspondant au miARN dit passager ou miARN\*, subit une dégradation rapide par les exonucléases.

Le brin guide du duplex, correspondant au miARN conservé dans le complexe miRISC, présente généralement une extrémité 5' moins stable thermodynamiquement que le brin éliminé. À cette extrémité, les bases uracile et adénine sont notamment préférables aux bases cytosine et guanine (Frank et al., 2010). Les caractéristiques structurelles du duplex et leur composition de séquence contribuent également à cette sélection (H. Y. Hu et al., 2009; Kawamata et al., 2009). Elle n'est toutefois pas stricte, le brin non favorisé peut être également sélectionné avec une fréquence variable. Ces changements de bras peuvent s'expliquer, en partie, par le traitement alternatif de Drosha, qui modifie cette stabilité thermodynamique (Wu et al., 2009).

Ainsi, le miARN guide oriente miRISC vers les cibles d'ARN complémentaire par appariement de bases. C'est notamment sa séquence seed, située aux positions 2 à 7 de l'extrémité 5', qui sert de signal de nucléation pour reconnaître les sites seed de l'ARNm (Figure 18) (Bartel, 2018). Cette région cible correspond à une liaison Watson-Crick parfaite pouvant toutefois différer dans la combinaison du nucléotide en position 1 et dans l'appariement en position 8. De plus, la présence d'un site 3' supplémentaire d'appariement de 3 à 4 bases avec l'extrémité

3' du miARN améliore l'efficacité de cette reconnaissance. Des sites non canoniques existent et correspondent à une reconnaissance modérément stricte de la séquence seed associée à un site d'appariement compensatoire en 3' plus étendu.

Le complexe miRISC reconnaît ainsi des sites cibles situés majoritairement dans la région 3'UTR de l'ARNm. Plus précisément, une séquence seed entourée de domaines riches en adénine et en uracile dans la région 3'UTR proche du cadre de lecture ouvert (*open reading frame*, ORF) semble être la cible privilégiée. Toutefois, il a été démontré que miRISC cible également la région 5'UTR et la région codante (Duursma et al., 2008; Lal et al., 2008; Ørom et al., 2008). Ces liaisons ne sont pas préférentielles car elles nécessiteraient de rivaliser avec celles des ribosomes se liant à la séquence codante et des complexes d'initiation de la traduction se liant à la région 5'UTR (Gu et al., 2009).

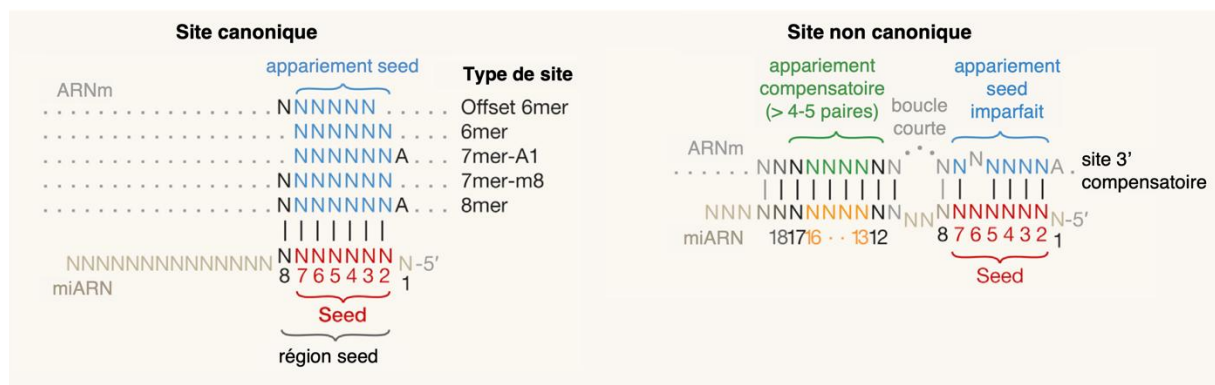


Figure 18 Sites cibles des miARN

Les sites canoniques des miARN comportent six à sept paires d'appariement Watson-Crick contiguës. Les sites canoniques les plus efficaces sont les sites de 7-8 nucléotides (nt) qui s'apparient parfaitement avec la séquence seed du miARN tandis que les sites de 6 nt sont les moins efficaces. Le site 3' compensatoire est un type fonctionnel de sites non canoniques qui n'a pas six paires d'appariement Watson-Crick contiguës à la région seed. La compensation de l'appariement imparfait de la région seed correspond à un appariement étendu à la région 3' de l'ADN. D'après (Bartel, 2018).

### 3.4.2. Mécanisme d'action de miRISC

Une fois activé, le complexe miRISC réprime l'expression des gènes cibles au niveau post-transcriptionnel en induisant la dégradation de l'ARNm ou en inhibant la traduction (Sheu-Gruttadauria & MacRae, 2018). Pour cela, des mécanismes distincts sont déployés en fonction de la complémentarité du miARN avec sa cible. En effet, lorsque le miARN présente une complémentarité complète avec l'ARNm cible, la régulation est effectuée par interférence ARN où miRISC est dirigé pour cliver l'ARNm cible. Ce mécanisme nécessite le recrutement Ago2 qui est la seule des quatre paralogues d'Ago à exercer cette activité endonucléolytique (Bhattacharyya et al., 2006; Gebert & MacRae, 2019). Ce mode de répression est la base des technologies d'élimination des ARNm médiées par les siARN, impliqués dans des complexes

siRISC, qui ont transformé la recherche biomédicale et sont prometteuses en clinique (Elbashir et al., 2001). Chez l'homme et les autres mammifères, le clivage dirigé par les miARN n'a été rapporté que pour 20 transcrits cellulaires, un ARN circulaire et quelques ARNm viraux (Shin et al., 2010; Yekta et al., 2004).

Cette complémentarité étant généralement insuffisante pour exercer une répression de la traduction et/ou la déstabilisation de l'ARNm, le recrutement de protéines supplémentaire est nécessaire. La dégradation des ARNm cibles représente, à l'état stable, la majeure partie (66-90%) de la répression médiée par les miARN observée dans les cellules de mammifères en culture (Eichhorn et al., 2014). Elle se produit par la dégradation de l'ARNm de 5' en 3' déclenchée après raccourcissement de la queue poly(A) de l'ARNm et l'élimination de la structure en coiffe en 5' (Figure 19). Pour cela, la protéine adaptatrice *trinucleotide repeat containing adaptor 6* (Tnrc6) est recrutée par Ago via son domaine PIWI (Eulalio et al., 2009). Ainsi recrutée, cette protéine de la famille Gw182, interagit avec la protéine cytoplasmique de liaison au poly(A) (*poly(A)-binding protein cytoplasmic*, Pabpc) associée à la queue poly(A) de l'ARNm et recrute Pan2-Pan3 et *C-C chemokine receptor 4* (Ccr4)-Not, des complexes de déadénylases ayant des actions consécutives et partiellement redondantes pour la raccourcir (Behm-Ansmant et al., 2006; Braun et al., 2011). La décapsulation est catalysée par la *decapping protein 2* (Dcp2) soutenue par l'action de ses cofacteurs Dcp1, *poly(A) tail length regulator 1* (Pat1), *enhancer of mRNA decapping protein 4* (Edc4) ou encore *DEAD-Box Helicase 6* (Ddx6) pour une activité enzymatique complète (Wilczynska & Bushell, 2015) (Figure 19). Ces derniers sont recrutés avant l'achèvement de la déadénylation déclenchant ainsi la décapsulation et la dégradation des ARNm cibles indépendamment du processus d'hydrolyse en cours. De façon intéressante, ces acteurs interagissent indépendamment de Tnrc6 et garantissent le recrutement de l'exoribonucléase 1 (Xrn1), la principale exonucléase cytoplasmique 5'-3', à l'endroit où les ARNm décapsulés sont produits, empêchant ainsi l'accumulation de ces derniers dans la cellule (Braun et al., 2012). Ces interactions sont facilitées par la grande concentration de ces protéines dans les p-bodies (J. Liu et al., 2005). Ces granules cytoplasmiques de stockage sont également le lieu de stockage et de dégradation des ARNm réprimés au niveau de la traduction.

A ce sujet, le recrutement de Tnrc6 entraîne également une traduction moins efficace de l'ARNm, bien que les mécanismes sous-jacents demeurent partiellement élucidés. Il semblerait que Ddx6 recruté par Ccr4-Not a également un rôle à jouer dans la répression de la traduction. En effet, cette hélicase interagit avec l'*eukaryotic initiation factor 4E* (eIF4E), facteur

d'initiation de la traduction, ayant une grande affinité pour la coiffe des ARNm (Dostie, 2000; Mathonnet et al., 2007). Il entre ainsi en compétition avec eIF4G, interagissant habituellement avec eIF4E, eIF4A et eIF3 associés à la sous unité ribosomique 40S. Ainsi, cette inhibition du recrutement du complexe 43S de pré-initiation (CPI) empêche l'accès à l'extrémité 5' de l'ARNm et le balayage de son extrémité 5'UTR pour reconnaître le codon initiateur de la traduction (Jackson et al., 2010). Il a également été démontré que cette interférence pourrait avoir lieu aux étapes post-initiation de la traduction via notamment la répression de la liaison de la sous unité 60S du ribosome (Petersen et al., 2006).

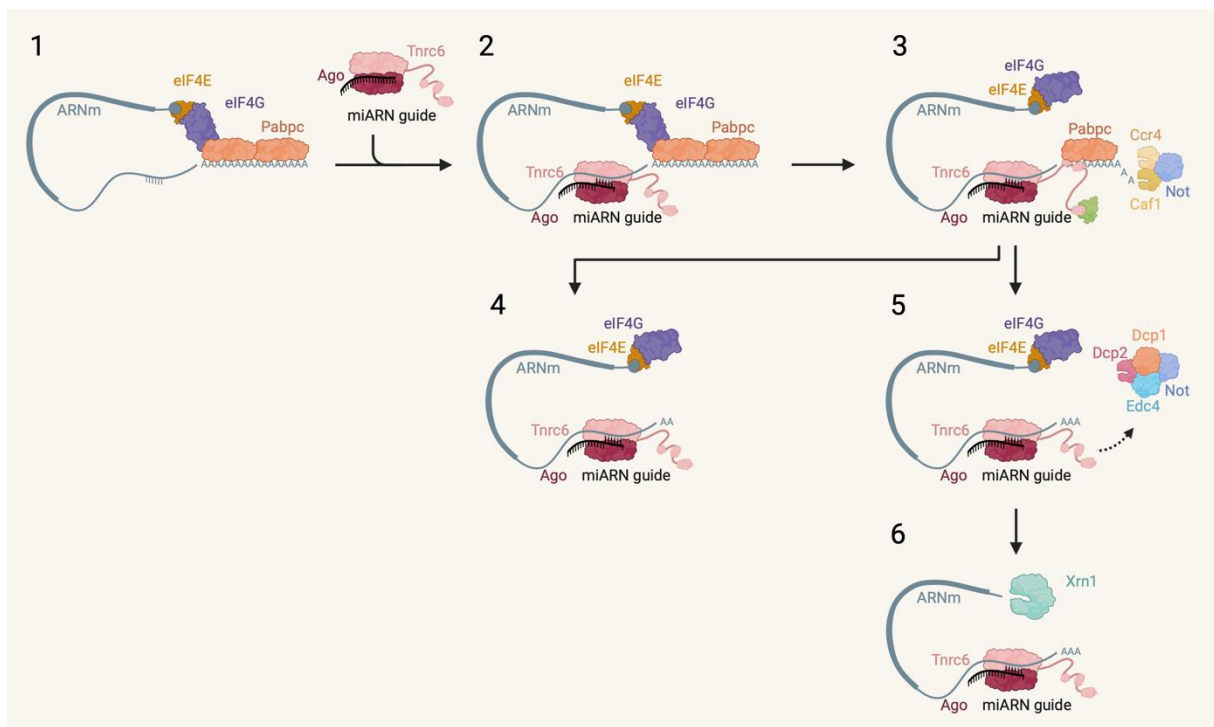


Figure 19 Mécanismes de la répression médiée par les miARN

1) L'ARNm cible est représenté dans une conformation en boucle fermée, obtenue par des interactions entre Pabpc lié à la queue 3' poly(A) et l'eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) lié à la protéine de liaison à la coiffe eIF4E. 2) Les miARN liés à Ago reconnaissent leurs cibles d'ARNm à des sites de liaison principalement dans la région 3'UTR de l'ARNm. Ago interagit avec Tnrc6 qui interagit à son tour avec Pabpc. 3) Le complexe Ago-Tnrc6 dirige l'ARNm vers la désadénylation. 4) Selon le type de cellule et/ou la cible spécifique, les ARNm désadénylés peuvent être stockés dans un état de répression traductionnelle. 5 et 6) Dans les cellules animales, les ARNm désadénylés sont décapsidés et rapidement dégradés par la principale exonucléase 5'-3', l'exoribonucléase 1 (Xrn1). D'après (Huntzinger & Izaurralde, 2011).

De façon intéressante, la majorité des miARN matures sont présents en quantité équivalente à l'intérieur et à l'extérieur du noyau (Chen et al., 2012; Jeffries et al., 2011). Des mécanismes de transport des miARN et des autres composants du complexe RISC ont été mis en évidence. Notamment, cette localisation nucléaire peut être conférée par la présence d'une séquence « AGUGUU » à l'extrémité 3' du miARN. Ainsi, alors que mir-29b qui possède cette séquence spécifique, est transloqué majoritairement dans le noyau, miR-29a appartenant à la même

famille mais n'arborant pas celle-ci, est majoritairement localisé dans le cytoplasme (Hwang et al., 2007). D'autres études ont rapporté l'implication de l'*exportin 1* (XPO1) dans le transport des miARN matures et des autres composants du complexe RISC (Ago1, Ago2, Tnrc6) du cytoplasme vers le noyau (Castanotto et al., 2009). Ainsi, la présence des acteurs du complexe miRISC suggère un rôle des miARN dans le noyau (Ameyar-Zazoua et al., 2012; Bottini et al., 2017). Il a notamment été rapporté que le miRISC pouvait interagir avec les ARNm à l'intérieur du noyau et induire leur dégradation (Nishi et al., 2013; Pitchiaya et al., 2017). Toutefois, les mécanismes sous-jacents ne sont pas clairs. L'enrichissement des complexes miRISC aux gènes activement transcrits suggère que cette interaction est co- ou post-transcriptionnelle (Huang et al., 2012; D. H. Kim et al., 2008).

### 3.5. Stratégies expérimentales et bioinformatiques pour l'identification des cibles des miARN

La compréhension des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle impliquant les miARN étant complexe, l'identification de leurs cibles fonctionnelles dans des contextes cellulaires et environnementaux spécifiques constitue actuellement un défi majeur (Bandyopadhyay et al., 2015; Quillet et al., 2021). Afin de relever cet objectif, diverses techniques de biologie moléculaire et cellulaire peuvent être employées dont notamment l'approche de rapporteur luciférase-3'UTR qui permet la mise en évidence de l'interaction directe entre le miARN et sa cible (Campos-Melo et al., 2014). En outre, l'évaluation de la répression transcriptionnelle et traductionnelle résultant de cette interaction peut être appréhendée par PCR quantitative et western-blot. Ces techniques sont toutefois chronophages et ne valident qu'un nombre limité d'interactions à la fois. Afin de pallier ces limitations, des approches d'identification massive de sites de liaison du complexe RISC sur les ARNm ont été élaborées telle que le *Cross-Linking and Immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing* (CLIP-seq) et le *Cross-Linking, Ligation and Sequencing of Hybrids* (CLASH) (Kato, 2023). L'avantage du protocole CLASH par rapport aux expériences de CLIP-seq réside dans sa capacité à fournir à la fois les séquences des miARN et de leurs cibles correspondantes (Quillet et al., 2021). Cette technique a ainsi permis l'identification de plus de 18 500 interactions dans les cellules humaines révélant ainsi de nombreuses interactions non-canoniques (Helwak et al., 2013).

D'autre part, la complexité de la régulation génique par les miARN est également appréhendée par de nombreux logiciels bioinformatiques. Parmi eux, des outils tels que miRanalyzer et miRDeep sont utilisés pour l'identification des miARN qu'ils soient conservés, prédits à grande

échelle dans le génome ou détectés à partir de données de séquençage de nouvelle génération (*next-generation sequencing*, NGS) (Friedländer et al., 2012; Hackenberg et al., 2011). Des logiciels tels que ViennaRNA et RNAstructure s'avèrent précieux pour prédire et analyser les structures secondaires et tertiaires des miARN, lesquelles jouent un rôle crucial dans leur interaction avec d'autres molécules, notamment des protéines de liaison (Bellaousov et al., 2013; Lorenz et al., 2011). Par ailleurs, une pléthore de logiciels bioinformatiques, à l'instar de TargetScan, miRanda, miRMap et SVMicrO permettent la prédiction des cibles des miARN (Agarwal et al., 2015; John et al., 2004; H. Liu et al., 2010; Vejnar et al., 2013). Ces derniers évaluent l'hybridation du miARN à sa cible tout en intégrant divers paramètres tels que la conservation du site d'interaction, le contexte structural ou certains paramètres thermodynamiques (pour revue : (Quillet et al., 2021)). Diverses stratégies, s'appuyant sur l'utilisation de méthodes statistiques et/ou des données expérimentales, ont récemment été conçues dans le but d'améliorer les performances des logiciels de prédiction. En particulier, mirDIP et miRabel exploitent l'union de plusieurs bases de données pour agréger, reclasser et calculer un nouveau score des interactions prédites (Quillet et al., 2020; Tokar et al., 2018). Ainsi, ces logiciels d'agrégation réalisent de meilleures performances que les outils de prédiction des interactions pris individuellement. Toutefois, malgré ces avancées significatives, il persiste une prévalence élevée de faux positifs (Pinzón et al., 2017). Enfin, des outils et bases de données tel que HMDD ont été développés pour associer les miARN à des phénotypes et notamment des maladies humaines (Y. Li et al., 2014). À l'heure actuelle, ces outils expérimentaux et bioinformatiques ne permettent pas de saisir toute la complexité de la biologie des miARN, ils restent toutefois indispensables lors d'approches globales à grande échelle.

### 3.6. Implication des miARN dans les cancers

Les miARN, essentiels au maintien de l'homéostasie, régulent finement l'expression des gènes via un mécanisme dynamique et robuste. De nombreux miARN présentent ainsi un modèle d'expression spécifique aux tissus suggérant qu'ils jouent un rôle essentiel dans le développement, la fonction et le maintien des tissus et des organes (Landgraf et al., 2007).

De ce fait, il est clairement établi que la dérégulation de l'expression des miARN est associée au développement de pathologies dont le cancer. Notamment, les analyses d'échantillons tumoraux et de tissus normaux ont permis de classer et grouper divers cancers en fonction de leur miRnome (J. Lu et al., 2005). Outre la distinction des tumeurs et des tissus normaux, le profil d'expression des miARN est spécifique des caractéristiques clinico-pathologiques telles

que le stade, l'agressivité ou encore l'invasion vasculaire (Calin & Croce, 2006). Ainsi, certains miARN fonctionnent comme des suppresseurs de tumeurs ou comme des oncogènes dont la perte ou la surexpression, respectivement, influencent dramatiquement l'évolution de la maladie (Dalmay & Edwards, 2006). Toutefois, plusieurs études ont montré que l'expression des miARN est globalement diminuée dans les cellules tumorales par rapport au tissu normal et proposent d'utiliser le miRnome comme un outil de diagnostic et de pronostic (J. Lu et al., 2005). Manifestement, il a été montré qu'une déplétion globale des miARN par knockdown de la machinerie de maturation stimule la tumorigenèse *in vivo*, suggérant que l'altération de l'expression des miARN contribuerait activement au développement du cancer (Kumar et al., 2007).

Les causes de cette dérégulation ne sont que partiellement élucidées. Parmi elles, des aberrations chromosomiques telles que des délétions, des amplifications ou encore des translocations qui accompagnent généralement le processus de tumorigenèse ont été identifiées. Notamment, il a été montré qu'environ 50% des miARN sont situés dans des sites fragiles et des loci de susceptibilité au cancer (Calin et al., 2004; Laganà et al., 2010). L'altération des activateurs ou répresseurs transcriptionnels des pri-ARN peut également entraîner une altération de la transcription de ceux-ci. Des facteurs épigénétiques peuvent également affecter l'expression des miARN. Notamment, des méthylations fréquentes de l'ADN dans les îlots CpG des miARN suppresseurs de tumeurs sont connues pour se produire dans les cancers. À ce sujet, il a été rapporté qu'un traitement des cellules cancéreuses avec des agents déméthylants de l'ADN a restauré l'expression des miARN suppresseurs de tumeurs miR-148a, miR-34b, miR-34c et miR-9 (Lujambio et al., 2008). Outre le taux de transcription du pri-miARN, le niveau d'expression d'un miARN mature est déterminé par l'efficacité de biosynthèse et de maturation de ses précurseurs et sa stabilité. Ainsi, les anomalies dans les gènes et les protéines impliqués dans ces fonctions ont des conséquences néfastes sur l'expression des miARN. Parmi ces acteurs, une diminution de l'expression de Drosha, observée dans certains types de cancers, est associée à la survenue de métastases, de phénomène d'invasion et d'une faible survie des patients (Lin et al., 2010). Concernant Dicer, sa sous-expression est associée à un mauvais pronostic pour les cancers du poumon et du sein par exemple (Merritt et al., 2008). Sa surexpression est associée notamment à la survenue de métastases dans le cancer de la prostate et le cancer colorectal (Chiosea et al., 2006; Faber et al., 2011). Il est toutefois important de souligner que les conséquences de cette dérégulation dépendent du microenvironnement



spécifique au type cellulaire pouvant fournir un répertoire différent des gènes cibles disponibles.

### 3.7. Implication des miARN dans les TNE, cas du PPGL

Ces dernières années, de nombreuses études ont mis en évidence l'implication des miARN dans différents aspects de la physiopathologie des TNE appuyant ainsi leur potentielle utilisation comme biomarqueurs diagnostiques et prédictifs (Geisler et al., 2021).

Parmi les miARN impliqués, ceux appartenant au locus 14q32 soumis à l'empreinte parentale, l'un des plus grands clusters de miARN polycistroniques, ont été décrits (Krokker et al., 2021). Plus précisément, l'adénome hypophysaire et le cancer papillaire de la thyroïde sont caractérisés par la sous-expression des miARN de ce domaine également appelé *delta-like 1 homolog-maternally expressed 3* (DLK1-MEG3), alors que les TNE du pancréas et le cancer médullaire de la thyroïde sont caractérisés par une surexpression de ceux-ci. De façon intéressante, le PCC montre des modulations complexes de l'expression de ces miARN. À l'inverse, leur expression est stable dans la circulation des individus en bonne santé faisant donc de ces derniers de potentiels biomarqueurs des néoplasmes neuroendocriniens.

La CgA est décrite comme étant le marqueur ayant certainement la plus grande spécificité et sensibilité dans le diagnostic des TNE (section 2.1). Elle reflète aussi la réponse tumorale au traitement mais n'a qu'une valeur limitée dans le processus de diagnostic initial (Lyubimova et al., 2016; Marotta et al., 2018). Une étude récente a évalué la valeur diagnostique des miARN circulants avec la CgA dans les TNE pancréatiques et le PPGL (Kövesdi et al., 2020). De manière intéressante, alors qu'aucun miARN seul ne pouvait être considéré comme un biomarqueur, l'expression de 33 miARN a permis de distinguer les échantillons tumoraux des témoins. Cette combinaison renforce donc le potentiel de la CgA en tant que biomarqueur.

L'implication des miARN dans la physiopathologie des PPGL a fait l'objet de quelques études transcriptomiques et a notamment permis d'identifier 230 d'entre eux, différenciellement exprimés par rapport à la surrenale normale (De Cubas et al., 2013). Une étude comparable a révélé 18 miARN différenciellement exprimés, dont les miARN sous-régulés miR-15a et de miR-16, dans les tumeurs métastatiques par rapport aux tumeurs bénignes (Meyer-Rochow et al., 2010). De façon intéressante, la restauration de ces deux miARN suppresseurs de tumeurs induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose par inhibition de la cycline D1 (CCND1) dans les cellules PC12, faisant d'eux des marqueurs diagnostiques et des cibles thérapeutiques potentielles. De surcroît, d'autres marqueurs de tumeurs métastatiques et récurrentes ont été identifiés dont

les miARN surexprimés miR-483-5p, miR-101, miR-1225-3p et miR-183 (Patterson et al., 2012). Par ailleurs, il a été montré que le cluster miR-182-96-183 n'est surexprimé que dans les tumeurs SDHB mettant ainsi en évidence l'association de certains miARN avec les clusters génétiques identifiés dans le PPGL (Castro-Vega et al., 2015) (section 2.2.7.3). De même, la surexpression de miR-133b et miR-210 est associée aux mutations SDH et VHL du cluster 1 (De Cubas et al., 2013). En ce sens, il a été démontré que SDH induisait cette surexpression du miR-210, marqueur de l'hypoxie tumorale ou hypoximiR, justifiant ainsi l'association de ce miARN avec des formes agressives de PPGL (Tsang et al., 2014). Concernant le cluster 2, les PPGL liés aux mutations de RET présentent une régulation positive de miR-885-5p et de miR-488. Enfin, miR-375 est retrouvé sous-exprimés au sein de tumeurs du cluster 3 présentant une fusion de MAML3 (Fishbein et al., 2017). De façon intéressante, l'hyperméthylation de l'ADN du cluster de miARN DLK1-MEG3, retrouvée dans près de 10% des échantillons de PCC, suggère un rôle driver de cette altération dans un sous-groupe de tumeurs sporadiques porteuses d'une mutation MAX (Castro-Vega et al., 2015; Igaz et al., 2015). Finalement, l'augmentation de l'expression de miR-137 et de miR-382 est globalement observée dans les PPGL hormis ceux mutés pour MAX.

Ces études transcriptomiques ont également mis en évidence des cibles thérapeutiques potentielles en médecine de précision, faisant du profilage de miARN un outil de stratification des risques associés aux PPGL. Notamment, une étude intégrative multi-omique pan-cancer a corrélé les niveaux de miR-21-3p avec l'expression du gène de la tubérine (*Tuberous Sclerosis Complex 2*, TSC2) inhibitrice de mTOR1, une activation de la voie mTOR et une signature prédictive de la sensibilité aux inhibiteurs de mTOR dans les PPGL et autres cancers (Calsina et al., 2019). Une sensibilité accrue à la rapamycine est observée et confirmée *in vitro* lors de l'expression de miR-21-3p proposant ainsi ce miARN comme marqueur du traitement par les inhibiteurs de mTOR.

### 3.8. Identification de miARN régulateurs de la sécrétion hormonale

Finalement, la question de l'implication des miARN dans l'hypersécrétion des PCC se pose. Bien qu'une hypersécrétion de catécholamines aux effets délétères soit décrite de manière approfondie, les origines de ces perturbations restent incertaines. À ce sujet, quelques études s'intéressent à la régulation du mécanisme d'exocytose par les miARN. Elles sont toutefois souvent restreintes à la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$ -pancréatiques et des insulinomes, les défauts de ce processus pouvant entraîner une hyperglycémie chronique et un diabète. Ces

cellules arborent en effet, une voie de la sécrétion régulée similaire à celle identifiée dans les cellules chromaffines en sécrétant de l'insuline en réponse à une glycémie élevée via la fusion dépendante calcium de granules de sécrétion avec la membrane plasmique.

Afin d'étudier l'importance des miARN dans ce contexte, Kalis et coll. ont généré une lignée de souris présentant une altération spécifique du gène *Dicer1* dans leurs cellules  $\beta$ -pancréatiques (Kalis et al., 2011). Ces souris ont présenté une réduction de l'expression génique de l'insuline accompagnée d'une altération de sa sécrétion à l'origine d'une hyperglycémie progressive et de la présentation d'un diabète à l'âge adulte. De plus, des analyses approfondies ont mis en évidence une réduction du nombre de granules et de leur amarrage démontrant ainsi le rôle essentiel des miARN dans l'homéostasie du glucose. Au-delà du rôle global de *Dicer*, des miARN individuels ont été identifiés comme des régulateurs majeurs de la sécrétion d'insuline par la cellule  $\beta$ -pancréatique.

C'est notamment le cas de miR-375 dont la surexpression dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques de souris est à l'origine d'une réduction de l'exocytose induite par le glucose (Poy et al., 2004). Inversement, son inhibition est à l'origine d'une sécrétion accrue d'insuline. Parmi les ARNm cibles identifiés, la myotrophine (*Mtpn*), impliquée dans le remodelage de l'actine et la fusion des granules d'insuline à la membrane plasmique, a été prédite et validée. Pour cela, il a été démontré que miR-375 interagit directement avec la région 3'UTR de l'ARNm de *Mtpn* entraînant la répression de sa traduction et l'inhibition la sécrétion d'insuline (Figure 20). De la même façon, *Mtpn* est ciblé par *let-7b* et miR-124 (Krek et al., 2005). Par ailleurs, le rôle majeur de miR-124 dans la sécrétion d'insuline est également bien décrit. Celui-ci, retrouvé surexprimé dans les cellules pancréatiques de sujets présentant un diabète de type 2, augmente la libération basale d'insuline tout en diminuant l'activité de la voie de l'exocytose. Cette régulation positive de miR-124 est associée à une augmentation de taux protéiques de *Snap25*, *Rab3a* et *Syn1* ainsi qu'une diminution des niveaux de *Rab27a* et de la *nucleolar complex protein 2* (*Noc2*) (Lovis, Gattesco, et al., 2008). Toutefois, parmi ces interactions, seule la GTPase *Rab27a* est la cible directe de miR-124. Il a été démontré que miR-96 est également à l'origine d'une diminution de l'expression de *Noc2*, effecteur des Rab GTPase. Ce miARN est également connu pour accroître l'expression de la granophiline (*synaptotagmine like 4*, *Syt14*), un autre effecteur des Rab GTPase et régulateur négatif de l'exocytose (Coppola et al., 2002; Gomi et al., 2005). La régulation de *Syt14* par miR-96 est indirecte et s'opère via la répression de *one cut homeobox 2* (*Onecut2*). Ce facteur de transcription réduisant l'expression du gène *Syt14*, son inhibition a pour conséquence une diminution de la sécrétion d'insuline (Plaisance et al., 2006; Roggli et

al., 2012). De la même façon, *Onecut2*, et donc *Syt14* indirectement, sont les cibles des miR-29a/b/c et de miR-9. D'autres cibles des miR-29a/b/c et de miR-9 sont connues. Notamment, miR-29a cible directement *Stx1* dans des cellules  $\beta$ -pancréatiques (Bagge et al., 2013). Cette interaction, validée par des approches de gène-rapporteur, entraîne la diminution des taux d'ARNm et protéiques de *Stx1*. Concernant miR-9, il a pour cible directe *Munc18*, confirmant ainsi son effet inhibiteur de la sécrétion d'insuline (Figure 20) (D. Hu et al., 2018). De la même manière, *Munc18* est également régulé par miR-218, miR-322 et miR-335 (Lang et al., 2015; Salunkhe et al., 2017). Par ailleurs, la surexpression de miR-335 est corrélée à une diminution de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose et associée à la réduction des niveaux protéiques de *Snap25*, *Syt11*. Cette régulation est toutefois indirecte et les mécanismes sous-jacents restent inconnus. Latreille et coll. ont également identifié miR-7a, dont l'expression est diminuée dans les îlots de patients et de souris diabétiques, comme régulateur négatif de la sécrétion d'insuline dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Latreille et al., 2014). À ce sujet, les souris transgéniques surexprimant miR-7a dans les cellules  $\beta$  ont développé un diabète en raison d'une altération de la sécrétion d'insuline et d'une dédifférenciation. De plus, l'inactivation conditionnelle de miR-7a-2 dans les cellules  $\beta$  entraîne une augmentation de l'activité d'exocytose et une meilleure tolérance au glucose. Cette observation corrèle avec une augmentation des taux protéiques de ses cibles directes, les protéines chaperonnes des protéines SNARE *Snca*, *Csp $\alpha$*  ou encore *Cplx1* stabilisatrice du complexe formé. En outre, miR-34a semble également appartenir à cet ensemble de miARN régulateurs de l'exocytose. Il a notamment été démontré que la surexpression de miR-34a, connu pour cibler *Vamp2*, diminue la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Lovis, Roggli, et al., 2008). MiR-153, dont l'expression est augmentée dans les cellules  $\beta$  traitées avec l'interleukine 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et dans les îlots primaires de rongeurs diabétiques, cible non seulement la protéine SNARE *Vamp2* mais aussi *Snap25* et *Stx1a*, perturbant ainsi l'arrimage des granules d'insuline (Sun et al., 2020). Dans ce contexte, Il a été montré que l'inhibition de l'expression de miR-153 permet de corriger le défaut de sécrétion basale d'insuline qui résulte de l'induction d'IL-1 $\beta$ .

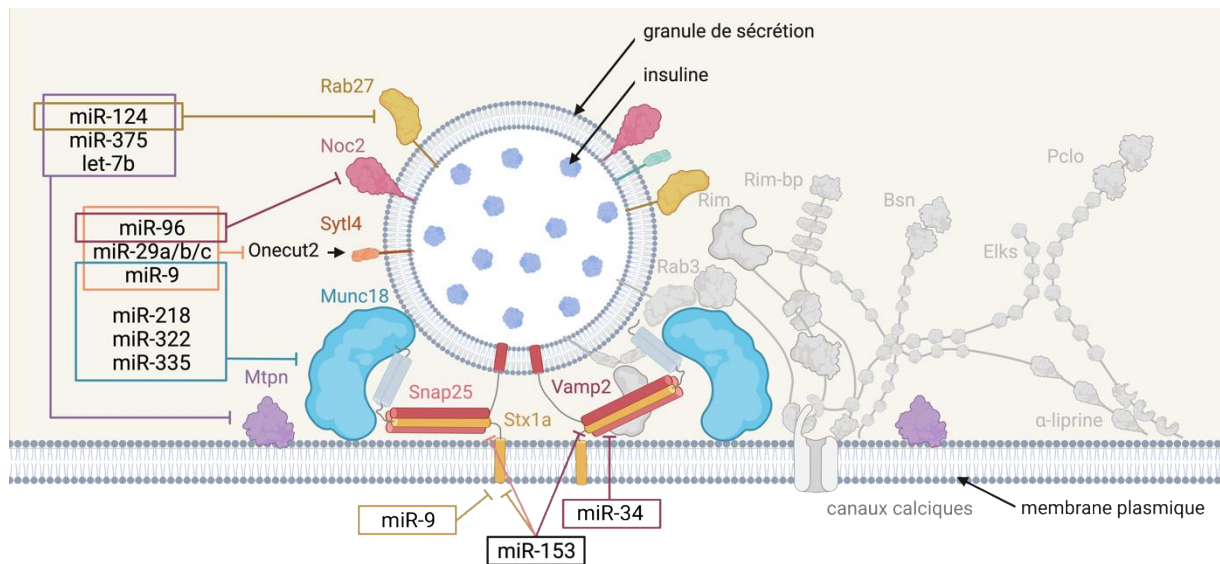


Figure 20 Identification d'un ensemble de miARN impliqués dans la régulation de la sécrétion d'insuline dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques

Dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, les protéines SNARE, essentielles à l'exocytose des granules d'insuline, sont régulées par un ensemble de miARN, notamment miR-9, miR-34 et miR-153. Ainsi, la régulation individuelle, ou dans certains cas, par un ensemble de miARN est identifiée pour les protéines de la zone active. La régulation de la granophiline (Syt4) par miR-96, les miR-29a/b/c et miR-9 est indirecte et met en jeu le facteur de transcription Onecut2. Les protéines de la zone active représentées en gris n'ont pas de miARN régulateurs identifiés.

Les protéines impliquées dans le processus de la sécrétion étant également nécessaires à la communication synaptique des cellules neuronales, certaines interactions ont été mises en évidence dans ce contexte. C'est notamment le cas de miR-153 surexprimé en réponse à une hypoperfusion cérébrale chronique ayant pour conséquence une altération de la libération des vésicules synaptiques. Ainsi, miR-153 régule l'expression de Stx1a, Snap25, Vamp2 et Syt1 en ciblant la région 3'UTR des gènes correspondant (Yan et al., 2020). Dans ce contexte également, il a été montré que miR-153 dérégule l'expression de Syn1 altérant ainsi le trafic des vésicules glutamatergiques dans l'hippocampe (S. Zhang et al., 2020). De plus, l'interaction de miR-153 et Snap25 semble également être essentielle à la neurotransmission et au neurodéveloppement (C. Wei et al., 2013). Également, le locus de miR-137, facteur de risque génétique associé à la schizophrénie est également associée à une altération de la transmission synaptique dans l'hippocampe de souris (He et al., 2018). Il a notamment été démontré que la surexpression de miR-137 a provoqué une réduction de 50% de la transmission synaptique liée à des altérations au niveau de l'amarrage des vésicules synaptiques, de la longueur de la zone actine et du nombre total de vésicules. Des analyses protéomiques également ont révélé une réduction des taux de protéines impliquées dans la synaptogenèse. Dans l'hippocampe également, il a été démontré que miR-485 exerce un rôle régulateur dans la plasticité synaptique en ciblant la protéine présynaptique Sv2a (Cohen et al., 2011). La surexpression du miARN

dans des cellules neuronales de l'hippocampe entraîne la réduction des réponses synaptiques spontanées et la diminution de la libération de neurotransmetteurs. Ces résultats suggèrent l'implication de miR-485 dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer et la maladie de Huntington, ce miARN étant retrouvé dérégulé dans ces pathologies neurologiques. À ce sujet, la surexpression miR-34c est corrélée à la réduction de Vamp2 ainsi qu'à l'altération de la plasticité synaptique associée à la maladie d'Alzheimer (S. Hu et al., 2015). L'expression de miR-128, régulant l'expression de Snap25 et Syt1, est également altérée dans la maladie (Shvarts-Serebro et al., 2021). Finalement, il a été montré que miR200b cible les membres de la famille Rab ; Rab21, Rab23, Rab18 et Rab3b (Q. Liu et al., 2014). Ce suppresseur de tumeur s'est avéré être un potentiel biomarqueur du gliome, et sa sous-expression est corrélée à un pronostic défavorable. De plus, la dérégulation de l'expression de ses gènes cibles est également associée à l'histopathologie tumorale.

Une régulation des gènes liés à l'exocytose par les miARN est également décrite dans d'autres contextes physiopathologiques, tels que les altérations des fonctions cardiovasculaires, métaboliques, immunitaires ou dans le cancer (D. Li et al., 2022; L. Li et al., 2019; Su et al., 2017; P. Zhang et al., 2020). Cependant, ces études ont évalué l'impact de cette régulation au niveau de la progression de la maladie sans établir de lien avec l'activité de sécrétion.

Ainsi, ces données non exhaustives de la littérature confirment l'hypothèse que la dérégulation des miARN, des régulateurs fins de l'homéostasie, est associée à une altération du mécanisme de la sécrétion régulée, notamment dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques et neuronales. Ce mécanisme étant également commun aux cellules du système neuroendocrinien, cela suggère que les miARN puissent également être impliqués dans la dérégulation hormonale observée dans les TNE et notamment de catécholamines dans le PCC.



## Objectifs de thèse

L'organisme opère des modifications continues compensatoires des fonctions corporelles afin de s'adapter aux perturbations intérieures et extérieures. Cette homéostasie est notamment préservée par le système neuroendocrinien qui ajuste la production et la sécrétion d'hormones de l'organisme. Parmi les cellules neuroendocrines impliquées, les cellules chromaffines de la médullosurrénale sécrètent des catécholamines en réponse au stress et permettent une réponse dite de « fight or flight » nécessaire à une distribution ajustée de l'énergie de l'organisme notamment par des modulations au niveau cardiovasculaire. Ces catécholamines sont sécrétées via un processus de sécrétion régulé par le calcium se concluant par l'exocytose, étape essentielle de la libération d'hormone dans la circulation sanguine.

Ainsi, une perturbation de ces mécanismes de régulation, notamment lors de l'induction d'une carcinogenèse, entraîne la perte de cette homéostasie cellulaire et tissulaire. De plus, du fait de leur fonction hormonale, l'induction de néoplasmes à partir de cellules neuroendocrines perturbe également l'homéostasie à l'échelle systémique. Le PCC, une tumeur neuroendocrine rare de la médullosurrénale, est caractérisé par une hypersécrétion de catécholamines à l'origine de répercussions délétères sur la présentation de la maladie mais également susceptible d'influencer son diagnostic, son pronostic ainsi que sa prise en charge. Les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents sont toutefois mal compris.

Ainsi, le premier objectif de cette thèse est d'identifier une éventuelle dérégulation de la voie de la sécrétion régulée des cellules de phéochromocytome. Nous cherchons à déterminer si cette hypersécrétion résulte seulement d'un effet de masse tumorale ou si un dysfonctionnement à l'échelle de la cellule individuelle est également impliqué.

Le second objectif consiste à évaluer l'influence des miARN dans cette dérégulation hormonale. Ces régulateurs post-transcriptionnels de l'expression des gènes orchestrent subtilement l'harmonie de l'expression des gènes. Leur influence spectaculaire à l'échelle macroscopique modèle ainsi le cours de la vie. Ainsi, une perturbation de leur expression, notamment lors de l'induction d'une carcinogenèse, accompagne la perte de l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Bien que l'implication des miARN dans la physiopathologie du PCC soit bien décrite, leur rôle dans l'hypersécrétion de catécholamines n'a jamais été démontré.





## Résultats

1. Le dysfonctionnement de l'exocytose régulée par le calcium au niveau de la cellule unique provoque une hypersécrétion de catécholamines chez les patients atteints d'un phéochromocytome

L'objectif de cette première étude est de caractériser la sécrétion de catécholamines des PCC afin d'identifier d'éventuels dysfonctionnements dans le mécanisme de la sécrétion régulée au sein de cette tumeur. Une prolifération anarchique des cellules et/ou une augmentation de la capacité sécrétoire à l'échelle de la cellule unique figurent parmi les hypothèses envisagées pour expliquer l'hypersécrétion de catécholamines.

Dans ce contexte, une cohorte de 22 patients présentant une hypersécrétion hormonale a été sélectionnée, caractérisée par un phénotype adrénérgique ou noradrénérgique dans respectivement 14 (64%) et 8 (36%) cas. Ainsi, l'activité de sécrétion des 22 échantillons de PCC humains et de 4 médullosurrénales non tumorales, fraîchement réséqués et mis en culture, a été comparée par ampérométrie à fibre de carbone. En effet, cette technique permet de mesurer, avec précision et à l'échelle de la cellule unique, les dynamiques d'évènements d'exocytose en temps réel. Ainsi, la comparaison de la distribution des paramètres ampérométriques a permis de mettre en évidence une augmentation significative du nombre de pics (ou spikes) ampérométriques mesurés par cellule, correspondant à une augmentation du nombre de granules exocytés, chez 16 (73%) des 22 patients. Ainsi, lors d'une même stimulation, le contenu d'un plus grand nombre de granules sécrétoires est libéré dans une cellule de PCC par rapport à une cellule non tumorale. De plus, une analyse des spikes ampérométriques individuels, fournissant des informations dynamiques précieuses sur le processus d'exocytose, a été réalisée et couplée à une analyse en composantes principales des données obtenues. En outre, les évènements d'exocytose sont significativement plus rapides dans les cellules tumorales, favorisant ainsi un recrutement plus important de granules lors d'une stimulation.

La dérégulation du mécanisme de l'exocytose ayant été ainsi avérée, une analyse protéomique, soutenue par une analyse de données transcriptomiques, a été effectuée. Notre objectif était d'explorer la possibilité d'une dérégulation potentielle des protéines clés de la machinerie d'exocytose des granules de sécrétion des cellules tumorales. À cette fin, une analyse par

spectrométrie de masse a été réalisée, comparant cinq échantillons de PCC humains appariés à leur tissus adjacents non tumoraux respectifs. Deux fractions subcellulaires principales ont été isolées de chaque échantillon : une fraction membranaire enrichie en organites et granules dérivées de la voie d'exocytose, et une fraction enrichie en protéines cytosoliques. À partir des données protéomiques obtenues, nous avons sélectionné des protéines en nous basant sur les termes GO associés à l'exocytose régulée (#BPGO :0045055) et aux granules de sécrétion (#CCGO :0030141). De plus, le niveau d'expression des protéines impliquées dans la synthèse, le stockage et le catabolisme des catécholamines ayant un impact majeur sur la quantité de catécholamines dans PCC, nous avons également inclus les protéines des termes GO associées au processus de biosynthèse des catécholamines (#GO :0042423), au transport des monoamines (#GO :0008504) et au processus catabolique de la dopamine (#GO :0042420). Dans ce contexte, nous avons identifiés 175 protéines dérégulées dont 59 provenant de la fraction enrichie en membranes, 63 protéines de la fraction cytosolique, et 53 communes aux deux fractions. Ces résultats mettent en lumière une régulation à la hausse des protéines essentielles au contrôle de la fréquence et la dynamique des évènements d'exocytose, ainsi que les enzymes impliquées dans la biosynthèse des catécholamines dans le PCC par rapport au tissu normal. De manière intéressante, ces données spécifiques permettent, grâce à la modulation de leur expression, une distinction claire entre les échantillons de PCC et les échantillons non tumoraux. Afin d'évaluer la pertinence de nos données protéomiques, nous avons comparé nos résultats à une analyse précédemment publiée sur l'expression génique de 60 PCC et 6 tissus normaux. Nous avons ainsi identifié 183 gènes présents dans au moins un des cinq termes GO utilisés dans notre analyse protéomique, et qui sont significativement dérégulés dans le PCC par rapport au tissu normal. Il est intéressant de noter que 64 de ces gènes sont communs à notre ensemble de données protéomiques. Comme observé précédemment, une classification hiérarchique de ces 64 gènes dérégulés permet une ségrégation claire entre les échantillons tumoraux et les échantillons normaux. De plus, l'expression de 58 (91%) de ces 64 gènes présente la même tendance à la variation que l'expression de la protéine, tant dans la fraction membranaire que cytosolique. Finalement, afin d'évaluer les liens les protéines dérégulées identifiées, nous avons réalisé une analyse de réseau d'interaction protéine-protéine. Nous avons ainsi identifié un cluster principal de protéines surexprimées à la fois au niveau génique et protéique. Ces protéines sont notamment impliquées dans la composition des granules de sécrétion (CHGA, CHGB, SCG2, SCG3, SCG5), le métabolisme des catécholamines (TH, DDC, DBH), le transport vésiculaire des monoamines (VMAT/SLC18A-1 et -2) ainsi que dans l'amarrage et la fusion de granules. Dans ce dernier aspect, elles comprennent des protéines

SNARE ainsi que des protéines interagissant avec ce complexe (SNAP25, STX1A, STXBP1, SYT1).

Ainsi, l'analyse exhaustive de ces données révèle que l'hypersécrétion de catécholamines dans le PCC ne résulte pas seulement d'une prolifération tumorale accrue, mais également d'une perturbation du mécanisme d'exocytose régulée par le calcium au sein de ces cellules. Cette altération se manifeste par une augmentation significative de l'expression des protéines spécifiquement impliquées dans l'exocytose, à la fois au niveau transcriptionnel et protéique. Cette première mise en évidence établit un fondement robuste pour appréhender les mécanismes altérés de la sécrétion dans le PCC. L'objectif qui en résulte est l'identification et la compréhension des causes sous-jacentes de cette hypersécrétion hormonale.

Les résultats obtenus sont exposés dans le manuscrit intitulé « *Dysfunction of calcium-regulated exocytosis at single cell level causes catecholamine hypersecretion in patient with pheochromocytoma* » publié dans le journal « *Cancer Letters* » et que je signe en troisième auteur. Dans cet article j'ai exploité des données transcriptomiques et les ai comparés aux données protéomiques issues de l'analyse par spectrométrie de masse.

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

## Cancer Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/canlet](http://www.elsevier.com/locate/canlet)

## Dysfunction of calcium-regulated exocytosis at a single-cell level causes catecholamine hypersecretion in patients with pheochromocytoma

Sébastien Houy<sup>a,1</sup>, Laura Streit<sup>a,1</sup>, Inès Drissa<sup>b</sup>, Marion Rame<sup>a</sup>, Charles Decraene<sup>a,c</sup>,  
 Sophie Moog<sup>a</sup>, Laurent Brunaud<sup>d</sup>, Joël Lanoix<sup>e</sup>, Rabie Chelbi<sup>a,f</sup>, Florence Bihain<sup>d</sup>,  
 Stéphanie Lacomme<sup>g</sup>, Sandra Lomazzi<sup>g</sup>, Philippe Campoli<sup>h</sup>, Michel Vix<sup>i</sup>, Didier Mutter<sup>i</sup>,  
 Eustache Paramithiotis<sup>j</sup>, Christophe Dubessy<sup>b,k</sup>, Nicolas Vitale<sup>a</sup>, Stéphane Ory<sup>a,2</sup>,  
 Stéphane Gasman<sup>a,2,\*</sup>

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

<sup>b</sup> Univ. Rouen, INSERM, Normandie Univ., Différenciation et Communication Neuroendocrine, Endocrine et Germinale, F-76000, Rouen, France

<sup>c</sup> Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, F-67000 Strasbourg, France

<sup>d</sup> Département de Chirurgie Viscérale, Métabolique et Cancérologique (CVMC), INSERM NGERE-U1256, Université de Lorraine, CHRU NANCY, Hôpital Brabois adultes, F-54511, Vandœuvre-lès-Nancy, France

<sup>e</sup> Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC), Université de Montréal, Montréal, Canada, Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

<sup>f</sup> Inovarian, F-75005, Paris, France

<sup>g</sup> Centre de Ressources Biologiques Lorrain, CHRU Nancy, Hôpitaux de Brabois, F-54511, Vandœuvre-lès-Nancy, France

<sup>h</sup> Department of Biopathology, CHRU-ICL, CHRU Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy, France and Faculty of Medicine, Université de Lorraine, F-54511, Vandœuvre-lès-Nancy, France

<sup>i</sup> NHC Strasbourg, Service de Chirurgie Digestive et Endocrinienne des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital Civil, F-67000, Strasbourg, France

<sup>j</sup> CellCarta Biosciences, Inc., Montréal, Québec, H2X 3Y7, Canada

<sup>k</sup> Univ. Rouen, INSERM, CNRS, HERACLES, PRIMACEN, F-76000, Rouen, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Calcium-regulated exocytosis  
 Neuroendocrine secretion  
 Pheochromocytoma  
 Carbon fiber amperometry  
 Mass spectrometry

## ABSTRACT

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

\* Corresponding author.

E-mail address: [sgasman@inci-cnrs.unistra.fr](mailto:sgasman@inci-cnrs.unistra.fr) (S. Gasman).

<sup>1</sup> S. Houy and L. Streit contributed equally to this paper.

<sup>2</sup> S. Ory and S. Gasman contributed equally to this paper.

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215765>

Received 9 January 2022; Received in revised form 13 May 2022; Accepted 28 May 2022

Available online 6 June 2022

0304-3835/© 2022 Published by Elsevier B.V.

## 1. Introduction

Through the secretion of hormones and neuropeptides, the neuroendocrine system controls many vital functions such as metabolism, blood pressure, reproduction, growth and development, stress and eating behaviors, to only cite a few. Neoplasms can derive from all kinds of hormone secreting cells giving rise to a neuroendocrine tumor (NET). Thus, the NETs constitute a highly heterogeneous group of neoplasms, but share a common feature in that they are often associated with a deregulation of hormone secretion, mainly hypersecretion, which can induce symptoms and major clinical complications [1]. Therefore, the secretory pathways and their dysfunctions appear as an important issue to be considered in NETs. However, the cellular and molecular mechanisms underlying hypersecretory activity of NETs remain poorly known.

In neuroendocrine cells, hormones and neuropeptides are stored in large dense core vesicles (secretory granules) and are secreted through calcium-regulated exocytosis, a process that has been intensively studied for decades [2]. It involves several tightly regulated trafficking steps including the recruitment of the secretory granules to the cell periphery, their docking to exocytic sites of the plasma membrane, their priming and finally the fusion between the secretory granule membrane and the plasma membrane leading to the release of the intra-granular content [3, 4]. Chromaffin cells of the adrenal medulla, which store and then secrete catecholamines into the blood stream, have been widely used by us and others as an experimental model to uncover the molecular mechanisms controlling calcium-regulated exocytosis [5–7].

The NETs deriving from chromaffin cells of the adrenal medulla are called pheochromocytomas (Pheos) [8]. Most of the Pheos are responsible for catecholamine hypersecretion leading to clinical symptoms such as permanent or paroxysmal hypertension or to cardiovascular complications including myocarditis, Takotsubo syndrome and various forms of cardiomyopathies [8–11]. The reason for this excess of secretion is currently not known. Among the likely possibilities are an anarchic proliferation of secretory cells and/or an intensification of the secretory capacity at the single cell level. We therefore attempted to investigate the cellular mechanisms responsible for a possible specific secretory dysfunction in Pheos by performing carbon fiber amperometry on primary culture of human Pheo cells. This technique allows the precise measurement, in single cell, of individual exocytotic event dynamics in real time [12,13]. Combined with the detection, by mass spectrometry, of the expression change of exocytotic proteins in human Pheo tissues, it allowed us to reveal up-regulated exocytosis at the single cell level, and to identify specific steps of the exocytotic process that are dysregulated in the tumors, as well as potential actors of the molecular machinery triggering hypersecretion in Pheos.

## 2. Material and methods

### 2.1. Subjects and samples

The medical files of patients with Pheo admitted in 2 French centers (CHRU, Nancy-Brabois and NHC, Strasbourg) between 2004 and 2019 were retrospectively reviewed. We collected initial diagnosis, including a clinical examination looking for hormonal-related symptoms, and biological analysis. As recommended by the Endocrine Society clinical practice guideline published in 2014 [14], genetic testing for Pheo was proposed to patients to identify germline mutations in the major susceptibility genes (SDHB, SDHC, SDHD, VHL, NF1, RET, TMEM127, MAX) using Sanger sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Then, as recommended in the consensus statement published in 2017 [15], next-generation-sequencing (NGS)-based diagnostic was carried out for the more recent patients. Biological analysis comprised the measurement of metanephrine (MN) and normetanephrine (NMN) levels, in urine and/or plasma. When available, chromogranin A (CGA) measurements were also registered. Levels of free MN, NMN and CGA in plasma, as well as urinary levels of MN and

**Table 1**

Biological and clinical characteristics of the 22 patients from which Pheos were used for amperometric analysis.

CHARACTERISTICS, N AVAILABLE	
AGE AT DIAGNOSIS: (MEAN ± SD, YEARS), N = 22	50.3 ± 10.6
GENDER MALE/FEMALE: (%), N = 22	13/9 (59/41%)
SYMPTOMS AT DIAGNOSIS: N = 22	
TUMOR-RELATED SYMPTOMS (%)	4 (18%)
HORMONAL-RELATED SYMPTOMS (%)	16 (73%)
HORMONAL HYPERSECRETION:	
ADRENERGIC/NORADRENERGIC PHENOTYPE, N = 22	14/8
URINARY MN, ULN RATIO (MEAN ± SD), N = 19	9.3 ± 14.3
URINARY NMN, ULN RATIO (MEAN ± SD), N = 19	7.7 ± 5.7
PLASMA FREE MN, ULN RATIO (MEAN ± SD), N = 15	4.5 ± 5.1
PLASMA FREE NMN, ULN RATIO (MEAN ± SD), N = 15	6.1 ± 6.3
PLASMA CGA, ULN RATIO (MEAN ± SD), N = 12	3.3 ± 2.7
PATHOLOGY:	
TUMOR SIZE, CM (MEAN + RANGE), N = 21	4.5 (1.7–8)
KI-67, % (MEAN + RANGE), N = 12	2.0 (0–5)
PASS (MEAN + RANGE), N = 22	2.1 (0–6)
GENETICS: N = 16	
NO GERMLINE MUTATION (%)	9 (56.25%)
NF1	4 (25%)
RET	1 (6.25%)
SDHB	1 (6.25%)
SDHD	1 (6.25%)

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

NMN are presented as ratios normalized by the upper limit of normal range (ULN). Plasma and urinary MN or NMN levels reaching two-fold the upper limit of the normal range and/or CGA exceeding the upper limit of the normal range was defined as the threshold of abnormal hormonal secretion [8]. The ULN of free MN and NMN were 0.40 and 0.98 nmol/L in plasma and 1625 and 2620 nmol/24 h in urine, respectively. The upper reference limit for CGA was 100 mg/L. Catecholamine-producing phenotypes of Pheos were categorized as previously described [16]: adrenergic (AD) phenotype, when MN content exceeded 10% of the combined MN and NMN contents, or noradrenergic (NAD) phenotype when MN content remained below 10% of the combined MN and NMN contents. Pathological evaluation was reviewed, including tumor size, Ki-67 index and the PASS (Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score) as previously described [17]. Biological and clinical characteristics are summarized in Tables 1

**Table 2**

Biological and clinical characteristics of the 5 patients from which Pheos were used for proteomic analysis.

CHARACTERISTICS, N AVAILABLE	
AGE AT DIAGNOSIS: (MEAN ± SD, YEARS), N = 5	57.8 ± 8.3
GENDER MALE/FEMALE: (%), N = 5	2/3 (40/60%)
SYMPTOMS AT DIAGNOSIS: N = 5	
TUMOR-RELATED SYMPTOMS (%)	1 (20%)
HORMONAL-RELATED SYMPTOMS (%)	5 (100%)
HORMONAL HYPERSECRETION:	
ADRENERGIC/NORADRENERGIC PHENOTYPE, N = 5	4/1
URINARY MN, ULN RATIO (MEAN ± SD), N = 4	3.7 ± 4.2
URINARY NMN, ULN RATIO (MEAN ± SD), N = 4	6.8 ± 8.0
PLASMA FREE MN, ULN RATIO (MEAN), N = 2	3.0
PLASMA FREE NMN, ULN RATIO (MEAN), N = 2	3.0
PLASMA CGA, ULN RATIO (MEAN), N = 2	4.7
PATHOLOGY:	
TUMOR SIZE, CM (MEAN + RANGE), N = 5	4.9 (3–8)
KI-67, % (MEAN + RANGE), N = 3	3.3 (1–7)
PASS (MEAN + RANGE), N = 3	3 (0–9)
GENETICS: N = 3	
NO GERMLINE MUTATION (%)	3 (100%)

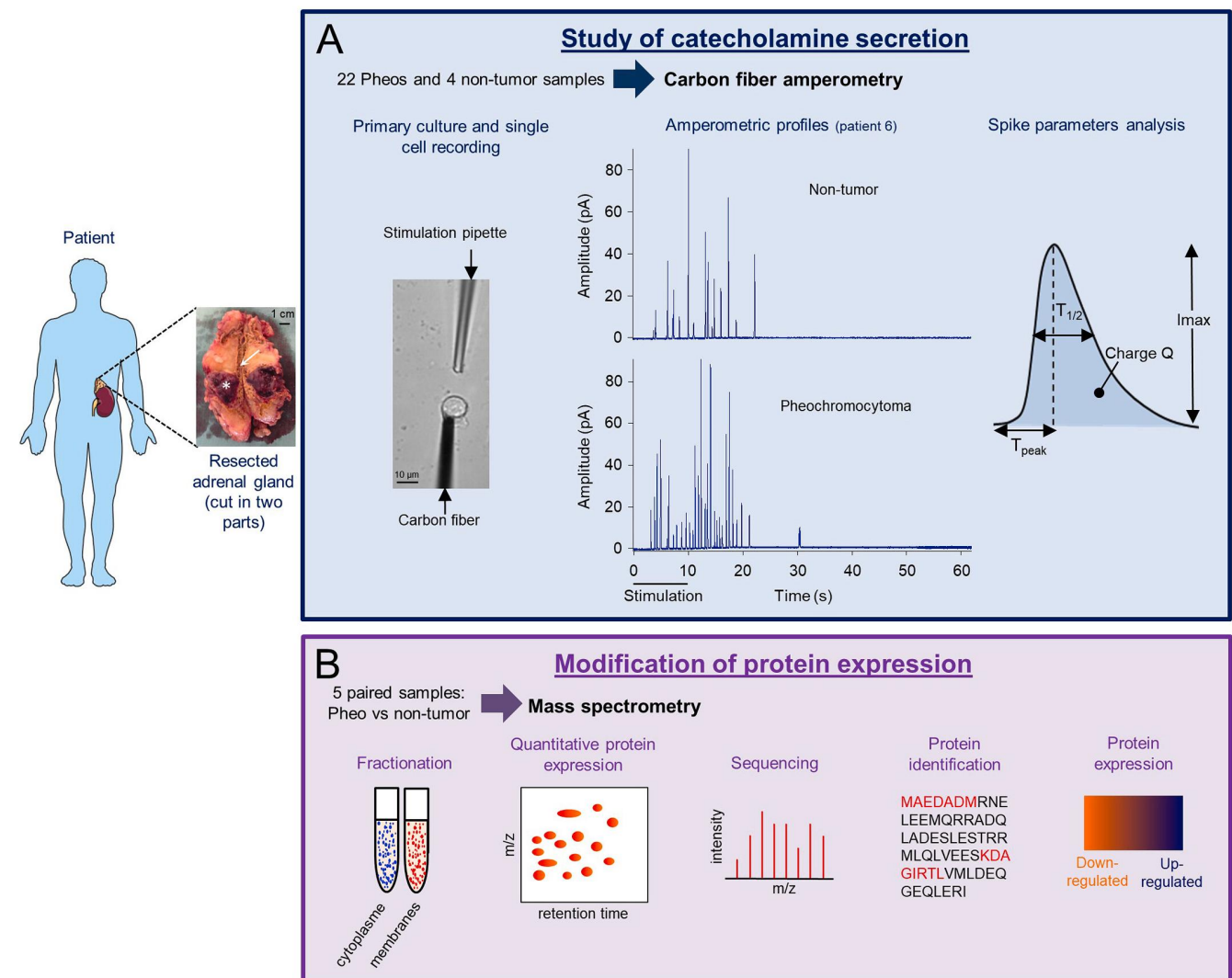
MN: metanephrine, NMN: normetanephrine, ULN: upper limit of normal range, CGA: chromogranin A, PASS: Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score.

and 2 whereas details per patient are described in Supplementary Table 1.

## 2.2. Primary culture of human pheochromocytoma and non-tumor cells

Human cells were cultured from freshly resected Pheos and non-tumor tissues. This culture was performed according to Moog and collaborators [18] with slight modifications. In the operating room and immediately after the resection, the adrenal gland was cut longitudinally in two parts (see Fig. 1), and Pheo and non-tumor parts were identified before sampling. Roughly a 1 cm<sup>3</sup> piece of tumor tissue was dissected and the non-tumor tissue was carefully dissected outside the tumor zone. Pieces were immediately plunged into ice cold transport medium (Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>-free Hank's Balanced Salt Solution (CMF HBSS, Sigma) supplemented with 0.2% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma) or MACS Medium Tissue

Storage solution (Miltenyi Biotec). Up to 3 h after resection, the tumor sample was minced into 1 mm<sup>3</sup> pieces in a dish containing CMF HBSS. The non-tumor sample was carefully dissected under a binocular magnifier to isolate the medullary part of the gland. Tumor chunks were collected, centrifuged at 250 g for 5 min at room temperature and the pellet resuspended in 15 mL of complete medium (RPMI 1640 Gluta-MAX™ (Gibco), 15% FBS, 1% penicillin/streptomycin). Red blood cells, debris and fat were separated from minced tissue by sedimentation for 15 min at room temperature. The supernatant was removed and 15 mL of complete medium was added to the pellet before centrifugation at 250 g for 5 min. Tissue pieces were resuspended in HBSS (in 10 times the tissue volume), containing 1.5 mg/mL of collagenase B (Roche) and 1 mg/mL of the protease dispase II (Gibco) and tumor or non-tumor samples gently rocked for 45 min or 20 min at 37 °C respectively. Non-tumor samples were gently triturated and incubated with enzymes for an additional 10 min. For tumor samples, 5 min before the end of



**Fig. 1. Technical workflow of catecholamine secretion measurement and comparative proteomic analysis of human Pheos.** Following total adrenalectomy, samples of Pheo (asterisk) and of non-tumor tissue (arrow) are collected and placed in culture for carbon fiber amperometry analysis (A) or proceeded for subcellular fractionation and mass spectrometry analysis (B). (A) Description of the different steps of the catecholamine secretion measurement by carbon fiber amperometry. Image showing a carbon fiber affixed to a cultured Pheo cell along with the pipette containing the stimulation solution. Representative amperometric profiles from a non-tumor cell and a Pheo cell are illustrated. The dark bar indicates when stimulation by 100  $\mu$ M nicotine solution was applied. The parameters of individual analyzed spike are indicated. (B) Complete protein profiling workflow of differential mass spectrometry analysis between Pheo tissue and matched non-tumor tissue. Note that due to the low amount of tumor and non-tumor samples, it is technically impossible to perform both amperometry and mass spectrometry experiments on the same samples.

protease digestion, 0.1 mg/mL DNase I (Roche) was added to remove potential DNA clumps. Tumor and non-tumor samples were left for a few minutes to sediment at room temperature then the supernatant was recovered (first fraction). The pellets were resuspended in 5 mL or 1 mL of CMF HBSS for tumor and non-tumor samples respectively, and triturated for a couple of minutes to dislodge cells from chunks. The remaining pieces were left for a few minutes to sediment and the supernatant was recovered (second fraction). All fractions were centrifuged at 800 g for 5 min at room temperature. Tumor pellets were resuspended in 2 mL of CMF HBSS and 4 mL of Red Blood Cell Lysis Buffer (Roche) was added before being gently rocked for 10 min at room temperature. They were then centrifuged at 500 g for 5 min. Finally the tumor and non-tumor pellets were resuspended into complete medium. Cell viability and density were estimated under a microscope and 300  $\mu$ L of cell suspension was seeded into type I collagen (Corning)-coated 35 mm dishes (MatTek). Cells were left to adhere overnight at 37 °C in an incubator with water-saturated and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. 2 mL of complete medium was added the following day and cells were used within two days.

### 2.3. Carbon fiber amperometry

Human tumor cells from freshly resected Pheo or non-tumor cells were washed with Locke's solution (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 11 mM glucose, 0.01 mM EDTA and 15 mM HEPES, pH 7.5) and processed for catecholamine release measurements by amperometry as previously described [19,20]. A carbon fiber electrode of 5  $\mu$ m diameter (ALA Scientific Instruments) was held at a potential of +650 mV compared with the reference electrode (Ag/AgCl) and approached close to one cell. Secretion of catecholamines was induced by a 10 s pressure ejection of a 100  $\mu$ M nicotine (Sigma) solution from a micropipette (Femtotips®, Eppendorf) positioned approximately 10  $\mu$ m from the cell and recorded over 60 s. The amperometric recordings were performed with an AMU130 amplifier (Radiometer Analytical), calibrated at 5 kHz, and digitally low-pass filtered at 1 kHz. Analysis of the amperometric recordings was performed as previously described with a macro (laboratory of Dr. R. Borges; <http://webpages.ull.es/users/rborges/>) written for Igor software (WaveMetrics), allowing automatic spike detection and extraction of spike parameters [21]. Only cells containing at least 5 spikes are included in the analysis. The spike parameters analysis was restricted to spikes with amplitudes higher than 5 pA, which were considered as exocytic events [13,22]. All spikes identified by the program were visually inspected. Overlapping spikes and spikes with aberrant shapes were counted in the total number of spikes and then discarded for parameters analysis. Quantal size (spike charge, Q) of each individual spike was measured by calculating the spike area above the baseline, the spike area being defined as the time integral of each transient current. I<sub>max</sub> was defined as the height of each spike, half-width as the width of each spike at half its height ( $T_{1/2}$ ) and  $T_{peak}$  as the spike rise time (Fig. 1A).

### 2.4. Tissue fractionation

Frozen tumor and matched non-tumor adjacent tissues were cut into small pieces (~10 mm<sup>3</sup>), and 3 mL of homogenization buffer (0.25 M sucrose, 10 mM Tris pH 7.4, 100 units/mL of DNase I, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, complete protease inhibitor EDTA-free cocktail) was added per tissue sample, homogenized twice for 10 s then once for 20 s using a polytron set at speed 4.0. Homogenates were filtered through a 180  $\mu$ m nylon and brought to 3 mL with the homogenization buffer, if necessary. For each sample, light membranes were obtained by isopycnic centrifugation using discontinuous sucrose gradients in which samples brought to 1.4 M sucrose were layered by 1.2 M and 0.8 M sucrose. After centrifugation at 155,000 g for 2 h at 4 °C, the light membrane fraction located at the 0.8 M–1.2 M sucrose interface was collected, snap-frozen in liquid

nitrogen and stored at –80 °C. The light membrane fraction was enriched with plasma membrane, Golgi, endosomes and secretory pathway associated membranes. The cytosol fractions were obtained by centrifuging 200  $\mu$ L of crude homogenates at 150,000 g for 1 h at 4 °C. The supernatants were collected, snap-frozen and stored at –80 °C.

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

### 2.5. Mass spectrometry analysis

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

To fractionate peptides by SCX chromatography, samples were solubilized with reconstitution buffer (0.2% v/v formic acid, 10% v/v acetonitrile for light membrane samples; 20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25% v/v acetonitrile for cytosol samples) and loaded on an SCX column. Three fractions were collected following elution using a salt gradient. At the end of each SCX fractionation batch, the collected fractions were stored at –80 °C. Once the SCX fractionation was completed, the fractions were freeze-dried and then desalted. The eluates were divided equally into two 96-well plates; one plate for LC-MS/MS analysis and the other plate as a back-up. All plates were vacuum evaporated and stored at –20 °C until analysis by LC-MS/MS. Samples were resuspended in 92.5/7.5 water/ACN+0.2% formic acid and analyzed by LC-MS/MS on a nano-Acquity UPLC (Waters) coupled to a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo). Survey (LC-MS) and tandem mass spectrometry scans (MS/MS) were acquired in the same run. The resolution for the MS and MS/MS scans were 70,000 and 17,500, respectively. Peptide separation was achieved using a Waters nanoAcquity Symmetry UPLC Trap column (180  $\mu$ m × 20 mm, 5  $\mu$ m particle size) and a Waters nanoAcquity UPLC BEH300 analytical column (150  $\mu$ m × 100 mm, 1.7  $\mu$ m particle size). The mobile phases were (A) 0.2% formic acid in water and (B) 0.2% formic acid in acetonitrile. For each sample approximately 3.6  $\mu$ g was loaded onto the trap column for 3 min at a flow rate of 10  $\mu$ L/min. Peptides were separated using a linear gradient (92.5% A to 84% A) for 26 min, followed by a second one (84% A to 75% A) for 14 min and a wash at 60% B for 2 min. The flow rate was 1.8  $\mu$ L/min. Protein identification was accomplished using data acquired by LC-MS/MS. The MS/MS spectra were matched to the corresponding peptide sequences found in the UniProt human protein database using Mascot (Matrix Science, version 2.2.06.) software.

### 2.6. Multiplexed multiple reaction monitoring (MRM) assay

For each of the selected proteins, five MRM-suitable peptides were selected by CellCarta's in-house MRM Peptide Selection software. If possible, peptides that were detected by mass spectrometry were prioritized. The selected peptides were synthesized by JPT Peptide Technologies (Germany). Synthesized peptides were resolubilized in 25%/75% water/DMSO (v/v), pooled and diluted with 0.2% formic acid in water to a concentration of 200 pmol/mL. This peptide mix was used to develop the MRM assay. The optimal 2 transitions (combination of peptide precursor and fragment ion mass-to-charge ratio that are



monitored by the mass spectrometer) per peptide were determined using selected reaction monitoring (SRM)-triggered MS/MS on a QTRAP 5500 instrument (AB Sciex) coupled to a nanoAcquity UPLC (Waters). An SRM transition was predicted for each peptide. The detection of this transition triggered the acquisition of a full MS/MS spectrum of the target peptide. The two most intense fragment ions (b or y fragment ions only) in the MS/MS spectrum for each acquired peptide were recorded by in-house developed software. The mass spectrometer collision energy (CE) was optimized for each transition with 5 different CE values automatically generated by in-house developed software. A solution containing all synthesized peptides at a concentration of 200 pmol/mL was analyzed with the created MRM method. The two best peptides per proteins were selected to be monitored by the MRM assay.

The processed samples were resolubilized with 11  $\mu$ L of a reconstitution solution containing 5 internal standard peptides each at 100 ng/mL. Eight  $\mu$ L of material ( $\sim$ 10  $\mu$ g) was analyzed by LC/MRM-MS. Peptide separation was achieved using a BioBasic C18 column (Thermo) (320  $\mu$ m  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m particle size). The mobile phases were (A) 0.2% formic acid in water and (B) 0.2% formic acid in acetonitrile. Peptides were separated using a linear gradient (92.5% A to 60% A) for 21 min, followed by a wash at 60% B for 2 min. The flow rate was 10  $\mu$ L/min. The transition peak areas were integrated using Elucidator software (Rosetta Biosciences) in combination with software developed at CellCarta for automated MRM peak integration.

### 2.7. Data processing and statistical analysis

For the analysis of the carbon fiber amperometry, data was first standardized (mean = 0 and variance = 1). Data was then normalized by quantile method using *preprocessCore* R package. PCA analysis was performed using *FactoMineR* and *factoextra* R packages. For comparison between tumor and non-tumor cells, non-paired Wilcoxon test was performed.

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

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

For Multiple reaction monitoring (MRM) analysis, differential intensity ratios were calculated in pair wise comparisons for each transition as the median of the ratio of the normalized intensities of each group. Paired Student's *t*-test was applied for the expression analysis.

Protein-level statistics were also computed by linearly combining the transitions of a given protein into a single variable and then a *t*-test was applied.

All differential expression analysis and data visualization were done using R. PCA analysis was done using *prcomp* function from stats R package and plotted using *ggplot2* R package. Volcano plot was performed using *EnhancedVolcano* function from R package.

### 2.8. Transcriptomic analyses

Gene expression data were retrieved from the GSE19422 dataset (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE19422>) [23] which includes 6 normal adrenal medulla and 61 Pheos. Consistently with the proteomic analysis, the 23 paraganglioma samples were not considered. The GSM483021 Pheo sample was excluded from our analysis because its transcriptomic profile, as revealed by clustering and UMAP analyses (data not shown), was similar to that of normal samples, suggesting that it was misidentified. The expression level of each gene was calculated as the geometric mean of the significantly differentially expressed probes identified with the GEO2R web tool using a Benjamin-Hochberg FDR correction (q-values < 0.05). Genes of the regulated exocytosis (#BPGO:0045055), secretory granule (#CCGO:0030141), catecholamine biosynthetic process (#GO:0042423), monoamine transport (#GO:0008504) and dopamine catabolic process (#GO:0042420) GO terms were then selected for further analysis. Unsupervised hierarchical clustering was performed with Bioconductor (v.3.13) and R software (v.4.1.0) using Pearson correlation as distance calculation and complete linkage. The Fold Change (FC) for each gene was calculated from the median expression values for the normal and Pheo groups and only those with a FC greater than or equal to 2 were retained for further analysis.

The correlation between the expression level of common genes and proteins was evaluated in both cytosolic and membrane fractions using Spearman correlation (GraphPad Prism v.8.1). In order to highlight functional clusters, an integrative analysis was conducted with Cytoscape software (v.3.8.2, [24]) using expression data and protein interaction data retrieved from STRING-DB (<https://string-db.org>, [25]). An edge-weighted force directed layout has been applied to the interaction network. Gene/protein clusters were identified using the CytoCluster plugin for Cytoscape using the default settings except for minimum size: 6, Minimum density: 0.25, Edge weights: combined score, Node penalty:1.

## 3. Results

### 3.1. Technical workflow and overall patient characteristics

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

For the 22 patients included in the amperometric analysis, a slight predominance of males was found (59%) and the mean age was  $50.3 \pm 10.6$  years at diagnosis (Table 1). All patients in the study presented hormonal hypersecretion (100%), including adrenergic or

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

Identification	Number of cells	Total number of spikes	Total number of spikes/cell	Number of analyzed spikes	Inax (pA)	Charge (pC)	T <sub>1/2</sub> (ms)	T <sub>peak</sub> (ms)
Non-tumor 6	19	224	11.79 ± 0.67	146	41.56 ± 2.23	2.22 ± 0.13	51.90 ± 1.14	42.21 ± 1.24
Non-tumor 7	11	164	14.91 ± 2.05	126	10.92 ± 0.81	0.92 ± 0.10	68.41 ± 3.41	29.87 ± 1.67
Non-tumor 12	8	144	18.00 ± 3.44	102	18.77 ± 2.35	0.73 ± 0.20	30.76 ± 3.94	13.50 ± 2.07
Non-tumor 23	6	214	35.67 ± 2.17	112	15.51 ± 1.65	0.97 ± 0.12	56.13 ± 4.26	28.50 ± 2.10
Patient 1	19	609	<b>32.05 ± 6.61**</b>	469	21.34 ± 2.16	<b>0.90 ± 0.10*</b>	<b>38.97 ± 2.70***</b>	<b>16.37 ± 1.41***</b>
Patient 2	22	653	<b>29.68 ± 3.26***</b>	518	<b>12.45 ± 0.65***</b>	<b>0.71 ± 0.04***</b>	52.11 ± 1.69	<b>23.69 ± 1.03***</b>
Patient 3	24	1388	<b>57.83 ± 8.01***</b>	1032	27.85 ± 2.91	1.79 ± 0.16	<b>61.69 ± 2.74*</b>	29.26 ± 1.42
Patient 4	4	39	9.75 ± 1.70	38	13.08 ± 3.20	0.71 ± 0.26	44.90 ± 8.53	21.05 ± 4.65
Patient 5	12	326	<b>27.17 ± 4.74*</b>	240	<b>13.82 ± 0.92*</b>	1.30 ± 0.11	<b>80.38 ± 5.65***</b>	36.49 ± 2.11
Patient 6	18	499	<b>27.73 ± 1.60***</b>	320	<b>45.78 ± 2.00***</b>	<b>2.33 ± 0.10***</b>	<b>48.34 ± 0.76*</b>	40.43 ± 0.90
Patient 7	17	524	<b>30.82 ± 3.32***</b>	408	<b>11.04 ± 0.58**</b>	0.96 ± 0.07	<b>69.70 ± 3.27**</b>	30.43 ± 1.43
Patient 8	6	185	<b>30.83 ± 5.46**</b>	163	30.99 ± 4.50	2.00 ± 0.29	65.30 ± 6.54	31.31 ± 2.67
Patient 9	31	682	<b>22.00 ± 1.85*</b>	416	<b>40.28 ± 1.61***</b>	1.71 ± 0.08	<b>40.29 ± 1.13***</b>	34.45 ± 1.18
Patient 10	59	1382	<b>23.42 ± 2.04*</b>	1231	21.26 ± 1.28	1.25 ± 0.08	52.81 ± 2.19	<b>26.49 ± 1.06**</b>
Patient 11	12	161	13.42 ± 1.31	130	17.39 ± 2.35	<b>0.85 ± 0.11*</b>	<b>42.54 ± 2.76*</b>	<b>19.00 ± 1.75***</b>
Patient 12	21	345	16.43 ± 2.01	292	20.17 ± 2.71	<b>0.81 ± 0.10**</b>	<b>35.45 ± 1.20***</b>	<b>16.75 ± 0.84***</b>
Patient 13	23	428	18.61 ± 2.16	353	<b>11.28 ± 0.81***</b>	<b>0.68 ± 0.05***</b>	52.01 ± 2.47	<b>25.47 ± 1.13**</b>
Patient 14	4	74	18.50 ± 5.24	59	27.09 ± 5.68	1.01 ± 0.14	<b>35.08 ± 1.80*</b>	<b>16.11 ± 0.79*</b>
Patient 15	9	315	<b>35.00 ± 6.88**</b>	187	<b>13.91 ± 1.93*</b>	<b>0.49 ± 0.08***</b>	<b>30.03 ± 1.99***</b>	<b>14.59 ± 1.13***</b>
Patient 16	12	482	<b>37.08 ± 5.96***</b>	334	21.58 ± 2.30	<b>0.93 ± 0.14*</b>	<b>37.39 ± 2.83**</b>	<b>20.30 ± 3.34**</b>
Patient 17	15	866	<b>57.73 ± 2.76***</b>	400	23.72 ± 1.15	1.04 ± 0.06	<b>39.65 ± 0.89***</b>	30.66 ± 0.84
Patient 18	9	266	<b>29.56 ± 5.66*</b>	140	19.18 ± 1.75	1.72 ± 0.24	<b>79.57 ± 6.60***</b>	<b>41.97 ± 4.35*</b>
Patient 19	9	270	<b>30.00 ± 5.31**</b>	197	<b>13.96 ± 1.03*</b>	<b>0.55 ± 0.04***</b>	<b>35.21 ± 1.19***</b>	<b>17.32 ± 0.74***</b>
Patient 20	9	379	<b>42.11 ± 5.25***</b>	276	15.84 ± 2.19	<b>0.60 ± 0.10***</b>	<b>33.53 ± 2.29***</b>	<b>16.95 ± 1.58***</b>
Patient 21	4	73	18.25 ± 4.23	59	16.29 ± 5.83	0.74 ± 0.19	45.37 ± 2.51	22.65 ± 1.94
Patient 22	5	151	<b>30.20 ± 5.42*</b>	82	25.13 ± 5.40	1.72 ± 0.30	65.82 ± 6.82	32.50 ± 3.74

Amperometric recordings were performed on primary culture of human Pheo cells or non-tumor cells. Cells were stimulated with 100 μM of nicotine for 10 s. The number of cells, the total number of amperometric spikes per cell and the different amperometric spikes parameters are indicated. Results represent the mean ± SEM. Bold values are considered significantly different from the non-tumor condition; \*p = 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 compared to the median of non-tumor cells; non-paired Wilcoxon test.

noradrenergic phenotype in 14 (64%) and 8 (36%) cases, respectively. However, only 16 patients (73%) were diagnosed with hormonal-related symptoms, and 7 patients out of 16 tested (44%) were diagnosed with a genetic predisposition for Pheo (4 *NFI*, 1 *RET*, 1 *SDHB* and 1 *SDHD*). The mean tumor size was 4.5 cm (range 1.7–8 cm). Other biological and clinical characteristics are detailed in Table 1.

Biological and clinical characteristics of the 5 patients included for the proteomic analysis are detailed in Table 2. They presented a mean age of  $57.8 \pm 8.3$  years, and all had hormonal-related symptoms at diagnosis, four of which being classified as adrenergic phenotype and one as noradrenergic phenotype. None of the patients had germline mutation (out of 3 patients tested). The mean tumor size was 4.9 cm (range 3–8 cm). Individual characteristics of the 27 patients can be found in Supplementary Table 1.

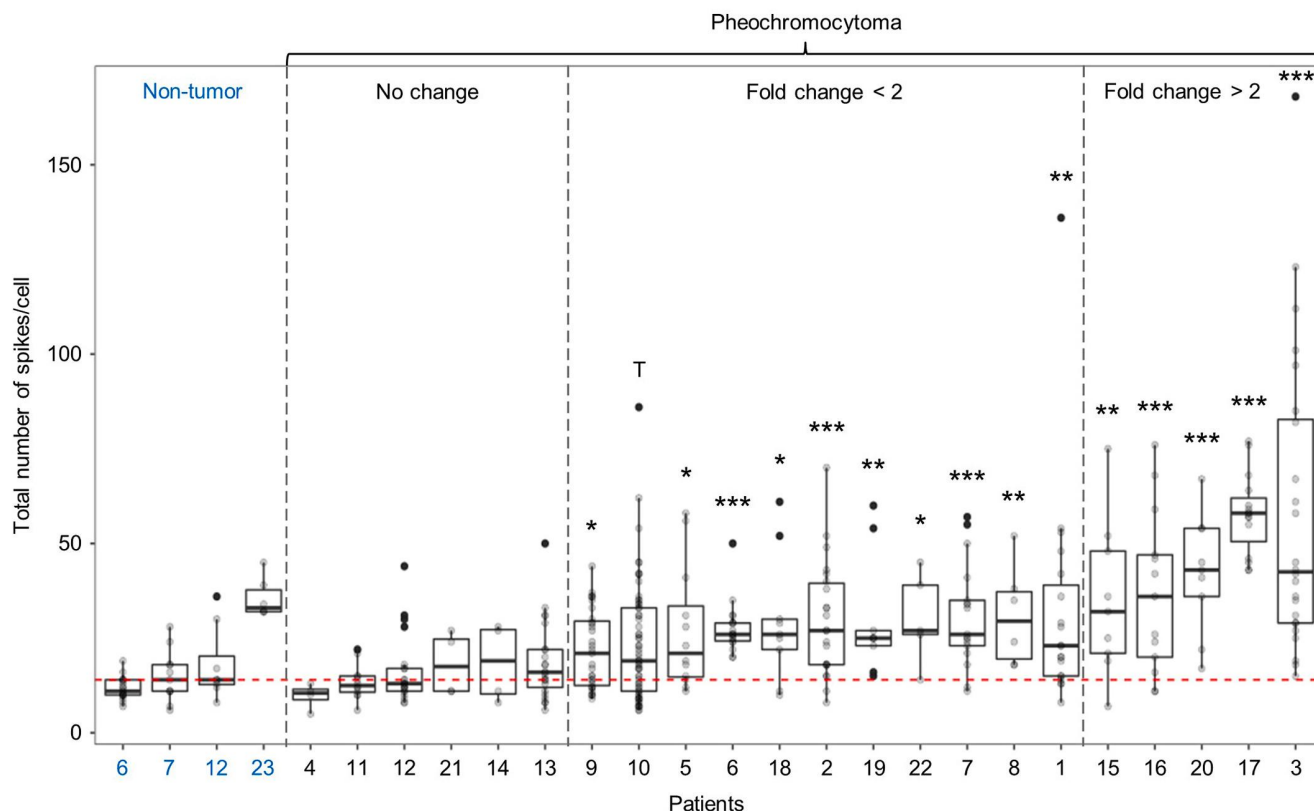
### 3.2. Analysis of catecholamine secretion in human pheochromocytomas by carbon fiber amperometry

Representative amperometric traces recorded from a non-tumor cell and a Pheo cell were illustrated in Fig. 1A. Each individual spike represents the release of catecholamine contained in a single granule and is composed of a rapid rise of the electrode current corresponding to the oxidation of catecholamines quickly released at high concentration through the fusion pore as it dilates. The spike rise is then followed by a slower decay representing a decreased of the catecholamine flux through the pore as the granule empties. In addition to the quantification of number of events per cell, the analysis of individual amperometric spikes provides valuable dynamic information on the exocytic process. Hence, the surface area or quantal size (*Q*) is proportional to the

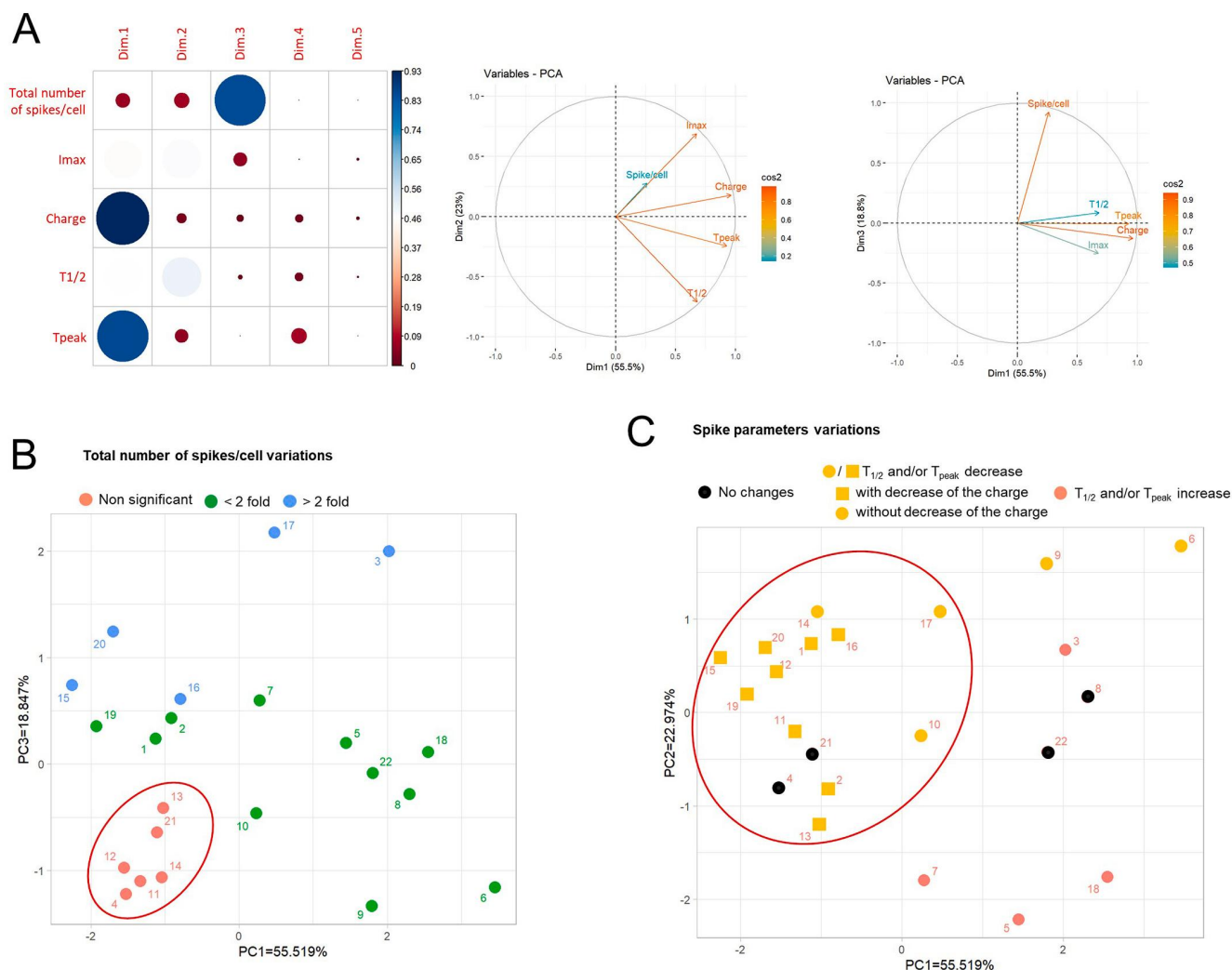
amount of catecholamine released per event, the spike amplitude value (*I<sub>max</sub>*) reflects the maximal flux of catecholamines, whereas the half-width (*T<sub>1/2</sub>*), and the time to peak (*T<sub>peak</sub>*) reflect the duration of the exocytotic event and the kinetics of the fusion pore expansion, respectively (Fig. 1A).

Primary culture of human Pheo cells is rather efficient as most attempts were successful. However, culturing non-tumor chromaffin cells taken outside the tumor zone appeared trickier and failed most of the time for unidentified reasons. Nevertheless, we were able to obtain 4 different cultures of non-tumor cells that could be used for amperometric recordings. Therefore, we have compared the distribution of the amperometric parameters of each of the 22 patients individually with the median values calculated from these 4 non-tumor samples. All the amperometric parameters are detailed in Table 3. The major change concerns the total number of spikes per cell. Indeed, among the 22 patients, 16 (73%) exhibit a significant increase of the number of spikes per cell (11 patients with an increase up to 2-fold and 5 patients with an increase above 2 and up to 3.4-fold; Fig. 2). Importantly, these data demonstrate that, upon the same stimulation, the content of a larger number of secretory granules is released in a Pheo cell compared to a non-tumor cell.

To better understand which parameters were mostly driving the secretory profiles of tumors and to sort out potential patient clusters, we performed a principal component analysis (PCA) using the amperometric data obtained from the 22 tumor cell cultures (Fig. 3). As shown in Fig. 3A, the 3 first principal components explain all the data variations (97.3%). The correlation matrix indicated that the main amperometric parameters explaining the variation of the data within the 2 first dimensions are the charge (*Q*) and the *T<sub>peak</sub>* and to a lesser extend the *T<sub>1/2</sub>*,



**Fig. 2.** Analysis of catecholamine secretion events in Pheo cells from each patient by carbon fiber amperometry. Box-and-whisker diagrams illustrating the distribution of the total number of amperometric spikes per cell for non-tumor cells and for cells from each patient with Pheo. Patients are classified according to the increasing effect of the total number of spikes per cell compared to the median of the non-tumor cells ( $n = 44$  cells, pooled from the 4 non-tumor samples): no significant change, fold change  $< 2$  and fold change  $> 2$ . The red dotted line indicates the median of non-tumor cells.  $T_p = 0.05$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  compared to the median of all the non-tumor cells; non-paired Wilcoxon test.

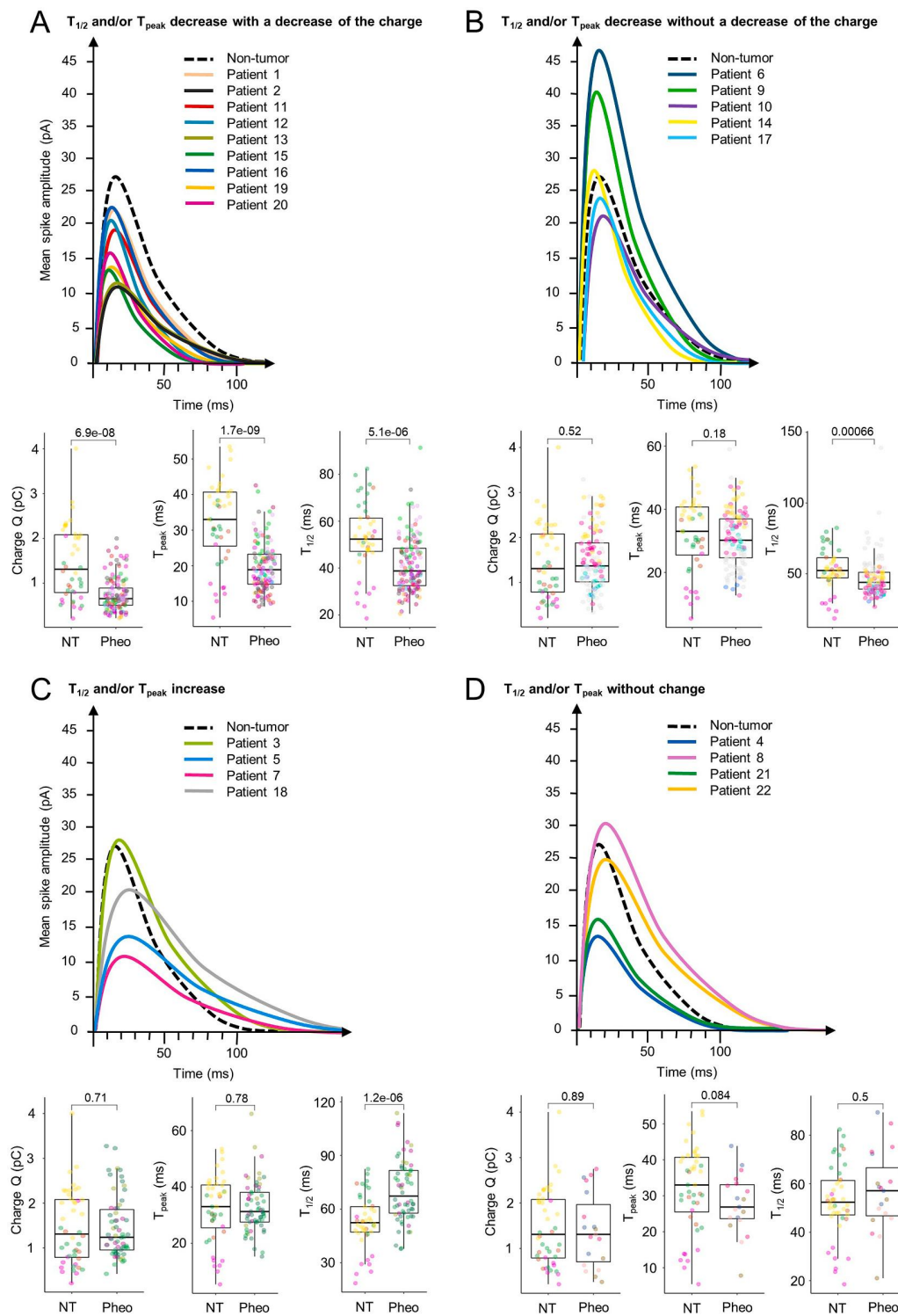


**Fig. 3. Principal component analysis (PCA) of amperometric spike parameters corresponding to catecholamine secretion recordings on tumor cells cultured from 22 patients with Pheo.** Total number of spikes/cell and spike parameters (I<sub>max</sub>, Charge, T<sub>1/2</sub> and T<sub>peak</sub>) were subjected to PCA. (A) Correlation matrix and variable factor maps along the PCA dimensions. The first, second and third dimension (Dim) of principal components explain 55.5%, 23.0% and 18.8% of the data variations, respectively. The spike parameters Charge and T<sub>peak</sub> largely contribute to Dim1, whereas T<sub>1/2</sub> and the total number of spikes per cell contribute to Dim2 and 3, respectively. PCA variable vector map showing the projection of I<sub>max</sub>, Charge, T<sub>peak</sub> and T<sub>1/2</sub> on Dim2 (middle) and Dim3 (right). The projection of each variable vector gives an indication of the relation of these variables to T<sub>peak</sub> and Charge (Dim1) or the total number of spikes/cell (Dim3). (B–C) The two-dimensional representation of PC1 and PC3 (B) allowed to separate patients according to the significant variation of the total number of spikes recorded per cell (red circle = no change; green circles = fold change <2; blue circles = fold change >2). The two-dimensional representation of PC1 and PC2 (C) revealed a large cluster of patients for which T<sub>1/2</sub> and/or T<sub>peak</sub> decreased (yellow squares and circles).

parameters that are all correlated as shown by the variable projection analysis. The total number of spikes per cell are less correlated and largely contributes to the third PCA dimension. Thus, it is interesting to note that the distribution of the patient samples plotted according to the first and the third component reveals a clear separation between populations with and without exocytic event increase as compared to non-tumor cells (Fig. 3B). The distribution of the patient samples plotted according to the two first components forms one major cluster including most of the patients for which the two kinetic parameters, T<sub>1/2</sub> and T<sub>peak</sub>, are significantly decreased (Fig. 3C). Indeed, in 14 (64%) tumors, cell cultures presented a significant reduction of the T<sub>1/2</sub> and/or T<sub>peak</sub>, often accompanied (9 patients) with a slight reduction of the quantal size (Charge Q; Fig. 4A and B and Table 3). This type of amperometric profile corresponds to exocytic events occurring with a faster kinetics compared to non-tumor cells. Interestingly, among these 14 patient samples, 10 displayed a concomitant increase of the total number of spikes per cell (Fig. 2).

On the contrary, only 4 patients' cultured cells (18%) displayed, a significant increase of their T<sub>1/2</sub> leading, for 2 patients, to a reduce spike amplitude (I<sub>max</sub>, patients 5 and 7, Fig. 4C and Table 3) and accordingly to a slower release kinetics. Four patients' cultured cells (18%) do not show significant changes in charge, T<sub>1/2</sub> or T<sub>peak</sub> indicating that the kinetic of the secretion is unaffected (Fig. 4D). Finally, it is interesting to note also that the quantal size of the spikes remained unchanged or slightly decreased for 21 patients indicating that the level of catecholamines per secretory granules does not increase in Pheo cells.

Altogether, our analysis of the amperometric recordings indicate that catecholamine secretion in tumor cells from patients with Pheo is increased because it involves a higher number of fusion events per stimulation compared to non-tumor cells. Moreover, in addition to being more numerous, the exocytic events are faster in tumor cells, which may contribute to recruit more granules upon similar stimulation.



**Fig. 4. Analysis of amperometric spike parameters in each patient's cells.** Superimposition of the averaged spike obtained from Pheo and non-tumor (NT) cells of each patient and distribution of the values corresponding to the spike charge (Q), the spike rise time ( $T_{peak}$ ) and the spike half-width ( $T_{1/2}$ ) are shown for the 4 different populations of patients: (A) decrease of  $T_{1/2}$  and/or  $T_{peak}$  with lower charge, (B) decrease of  $T_{1/2}$  and/or  $T_{peak}$  without lower charge, (C) increase of  $T_{1/2}$  and/or  $T_{peak}$  and (D) no significant change of  $T_{1/2}$  and/or  $T_{peak}$ . Box- and-whisker diagrams illustrate the distribution of each variable values pooled from all the patients belonging to the indicated secretory profile. P values are indicated and patients are color coded. All the average amperometric data are detailed in Table 3.

### 3.3. Differential protein expression of the exocytic machinery in human pheochromocytomas

Since catecholamine release is altered in Pheos, we asked whether proteins of the core machinery of secretory granule exocytic process could be deregulated. To do so, we performed a mass spectrometry analysis comparing 5 pairs consisting of human Pheos with their respective matched adjacent non-tumor tissues. To increase detection and sensitivity, we conducted the proteomic analysis on purified subcellular fractions in place of total homogenate. Two main subcellular fractions were isolated from each tissue sample, a membrane fraction enriched for organelles and vesicles derived from the exocytic pathway and a fraction enriched in cytosolic proteins. From our proteomic dataset, we selected proteins from the regulated exocytosis (#BPGO:0045055) and secretory granule (#CCGO:0030141) GO terms. Moreover, as expression level of proteins involved in catecholamine synthesis, storage and catabolism are known to impact the amount of catecholamines in Pheos, we have also included proteins from the catecholamine biosynthetic process (#GO:0042423), monoamine transport (#GO:0008504) and dopamine catabolic process (#GO:0042420) GO terms. We focused on proteins significantly up- or down-regulated in the tumor tissue by comparison with the corresponding non-tumor tissue, with fold change values greater than or equal to 2.

In these conditions, we identified 175 deregulated proteins: 63 proteins from the cytosolic fraction, 59 from the membranes-enriched fraction and 53 common to both fractions (Fig. 5A). Supplementary Table 2 details the median value of the relative expression changes of the 5 Pheos in comparison with their matched non-tumor tissues for all these 175 selected proteins, associated with their known function in exocytosis. The volcano plots in Fig. 5B show the relationship between the p-values and the fold change in expression for proteins detected in the cytosol or in membranes-enriched fractions. The unsupervised hierarchical clustering of all differentially expressed proteins in row according to the paired samples in columns, is presented in Fig. 5C for the corresponding cellular compartment. Note that the expression of proteins found in common in the membranous and the cytosolic fractions varies in the same direction (Supplementary Fig. 1). This specific dataset of proteins corresponding to the proteins involved in the machinery of secretory granule exocytotic process and in catecholamine metabolism clearly differentiates, by their modulation of expressions, the Pheo samples from the non-tumor samples. The functions of the deregulated proteins linked to secretory granule exocytosis include mainly: secretory granule organization and biogenesis, hormone processing and catecholamine metabolism, vesicular trafficking, docking, priming, membrane fusion, actin cytoskeleton organization, and small GTPases (Supplementary Table 2 and Fig. 5D). Hence, we observed that numerous secretory granule cargos, enzymes involved in the catecholamine metabolism as well as different proteins involved in the control of the frequency and the dynamic of the exocytic events are up-regulated.

To further assess the relevance of our data, we have compared our proteome dataset to a published gene expression analysis of 60 Pheos and 6 normal adrenal medulla tissues ([23] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE19422>). Using this analysis, we have extracted 183 genes that belong at least to one of the 5 GO terms used in the proteomic analysis and that are significantly differentially expressed by at least two-fold between Pheos and normal adrenal tissues. Interestingly, among these 183 genes, 64 are common to our proteome dataset. As observed at the level of the protein expression changes, the hierarchical clustering of these 64 differentially expressed genes efficiently separated the tumor samples from the normal adrenal tissues (Fig. 6A). Moreover, the expression of 58 of these 64 genes (91%) shows the same variation trend as the protein expression, both in the cytosol and in the membranes (Fig. 6B and C and Supplementary Fig. 2). To visualize whether the deregulated proteins identified in this comparison were highly connected to each other, we performed a protein-protein

interaction (PPI) network analysis using Cytoscape ([24], Fig. 7). Interestingly, one major significant cluster is composed of proteins that are overexpressed both at the protein and at the gene levels (blue squares). The cluster includes proteins involved in the secretory granule composition such as various chromogranins (CHGA, CHGB, SCG2, SCG3, SCG5), in catecholamine metabolism (TH, DDC, DBH), monoamine vesicular transport (VMAT/SLC18A-1 and -2) or hormone processing (PCSK1, PCSK2, CPE, PAM), in granule docking and fusion such as different SNAREs or SNAREs interacting proteins (SNAP25, STX1A, STXBP1, SYT1) and Rab GTPases (RAB3A, RAB3D, RAB27B).

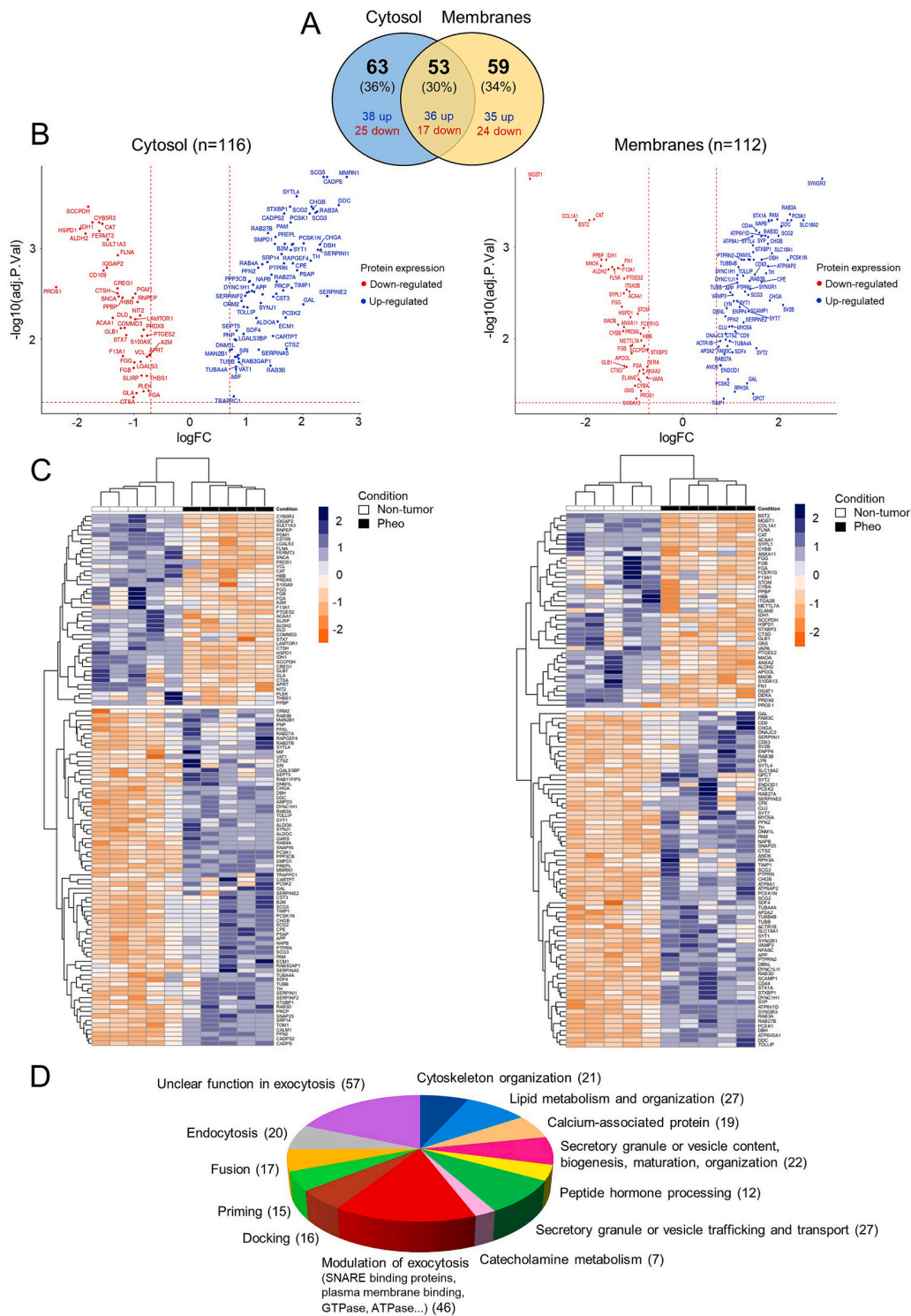
Finally, to further validate our dataset, we analyzed the global expression change of few key overexpressed proteins (17) selected from our proteomic dataset. To do so, we performed a multiplexed MRM-MS assay in total protein homogenates prepared from another independent cohort of 25 pairs of human Pheos and their matched non-tumor tissues [26]. As MRM is a targeted MS approach that uses synthetic peptide reference standards, it is used to confirm and quantify the presence of proteins of interest on smaller amounts of sample with high sensitivity, which eliminates the need for fractionation [27]. As observed for the subcellular fractions, using MRM-MS we found that the expression of the 17 selected proteins was also significantly increased in Pheos compared with the matched adjacent non-tumor tissues (Fig. 8).

## 4. Discussion

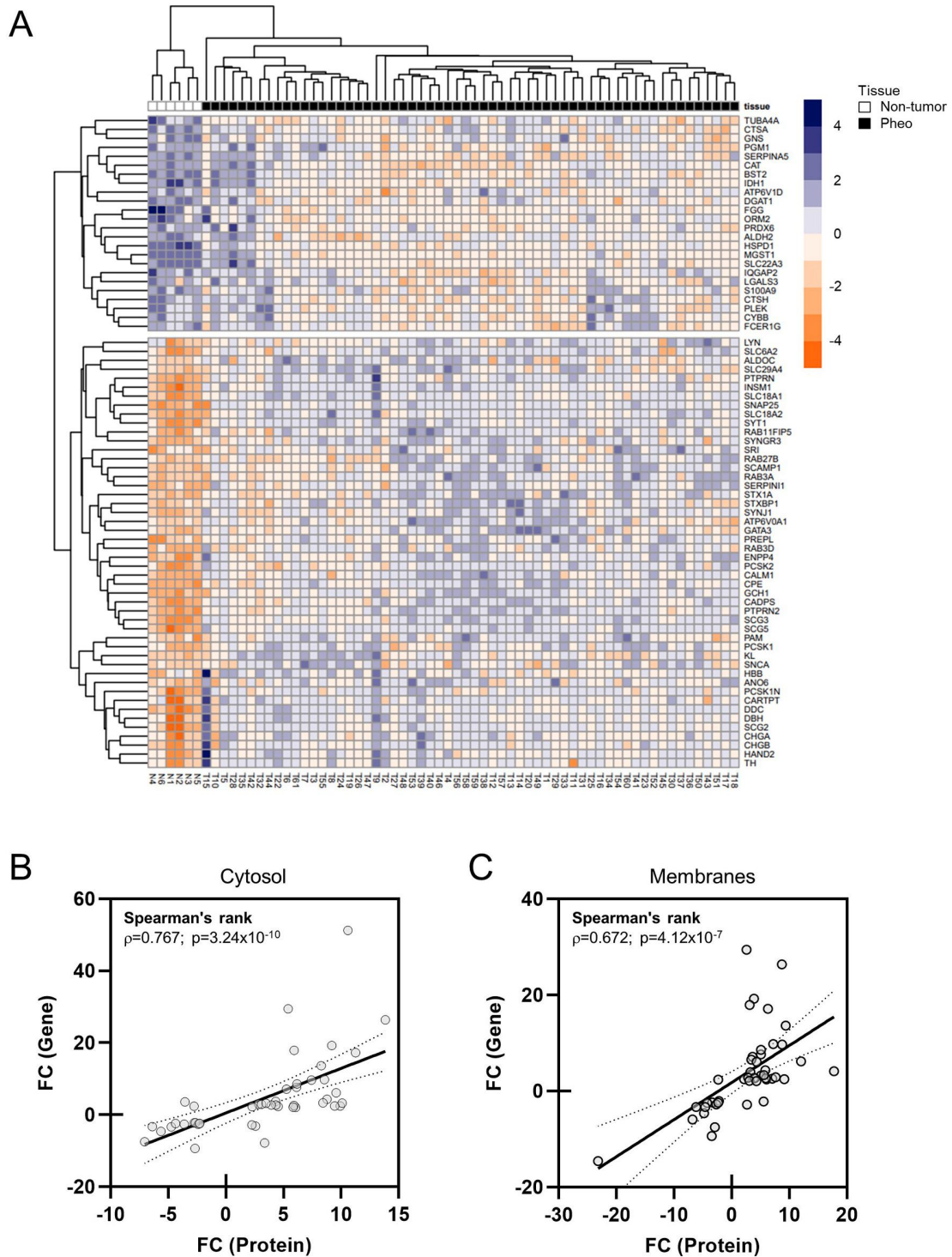
Dysfunction of hormones and neuropeptides secretion in NETs is a serious health issue. Patients with midgut primary carcinoids have increased serotonin and metabolite secretion, corresponding to higher metastatic tumor burdens [28]. Hypersecretion of serotonin by carcinoid tumor from the gastro-intestinal tract can trigger carcinoid syndrome, which is associated with severe consequences such as flushing, diarrhea, bronchoconstriction and cardiac valvular disease [28]. Acromegaly often results from excessive secretion of growth hormone by pituitary adenoma [29]. Excessive level of circulating catecholamines in patients with Pheo can trigger life-threatening medical problems such as cardiomyopathies and stroke [11,30]. Moreover, enhanced secretory activity of NET cells may develop over time with negative impact on prognosis. For example, silent pituitary adenoma can evolve into an active secreting adenoma whereas non-functional pancreatic tumor can become hormonally active, hence turning to a more aggressive tumor phenotype [31–33]. Small cell lung cancer (SCLC) is a high-grade malignant cancer due to the progressive neuroendocrine nature of SCLC cells that secrete a variety of neuropeptides, together with growth factors that all dramatically accelerate the invasive growth by their autocrine action [34,35]. Altogether, these few examples taken from a longer list clearly reveal that dysfunction of the secretory pathways in NETs can lead to severe clinical complications and can also impact the tumor development and prognosis. Today, a clear yet unmet need is to identify the cellular and molecular mechanisms triggering hypersecretory activity in NETs.

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

Numerous studies reported the up-regulation of mRNA or proteins controlling catecholamine synthesis leading to an increased level of catecholamines in Pheo tissues [36–40]. In agreement, we have found here by mass spectrometry that TH, DDC and DBH are significantly overexpressed in Pheos. How the excess of catecholamines is regulated at the cellular level remains an intriguing question. Subcellular catecholamine storage in chromaffin cells depends on a dynamic equilibrium between the active transport in the granule by the vesicular monoamine



**Fig. 5. Identification of differentially expressed proteins involved in the exocytotic pathway in human Pheo tissues.** (A) Venn diagram showing the distribution of the differentially expressed proteins in fractions enriched in cytosolic and membrane proteins. Colors indicate up- (blue) or down- (red) regulation. (B) Volcano plots of all differentially expressed proteins between Pheos and non-tumor samples. FC: fold change. (C) Two-way hierarchical clustering of paired samples from each patient (non-tumor in white and Pheo in black) in column according to the validated cytosolic (left) and membranous (right) proteins of the dataset in row. Protein expression values were z-score normalized prior to clustering using the complete-linkage method together with the Euclidean distance. Each row represents a differentially expressed protein and each column a patient according to the tissue type. The color scale illustrates the relative level of protein expression; blue, higher expression; red, lower expression. (D) Functional enrichment analysis of identified proteins. Each differentially expressed protein selected for their potential role in exocytosis (Supplementary Table 2) has been classified in one or several indicated biological functions. The number of proteins in each function is indicated in parenthesis.



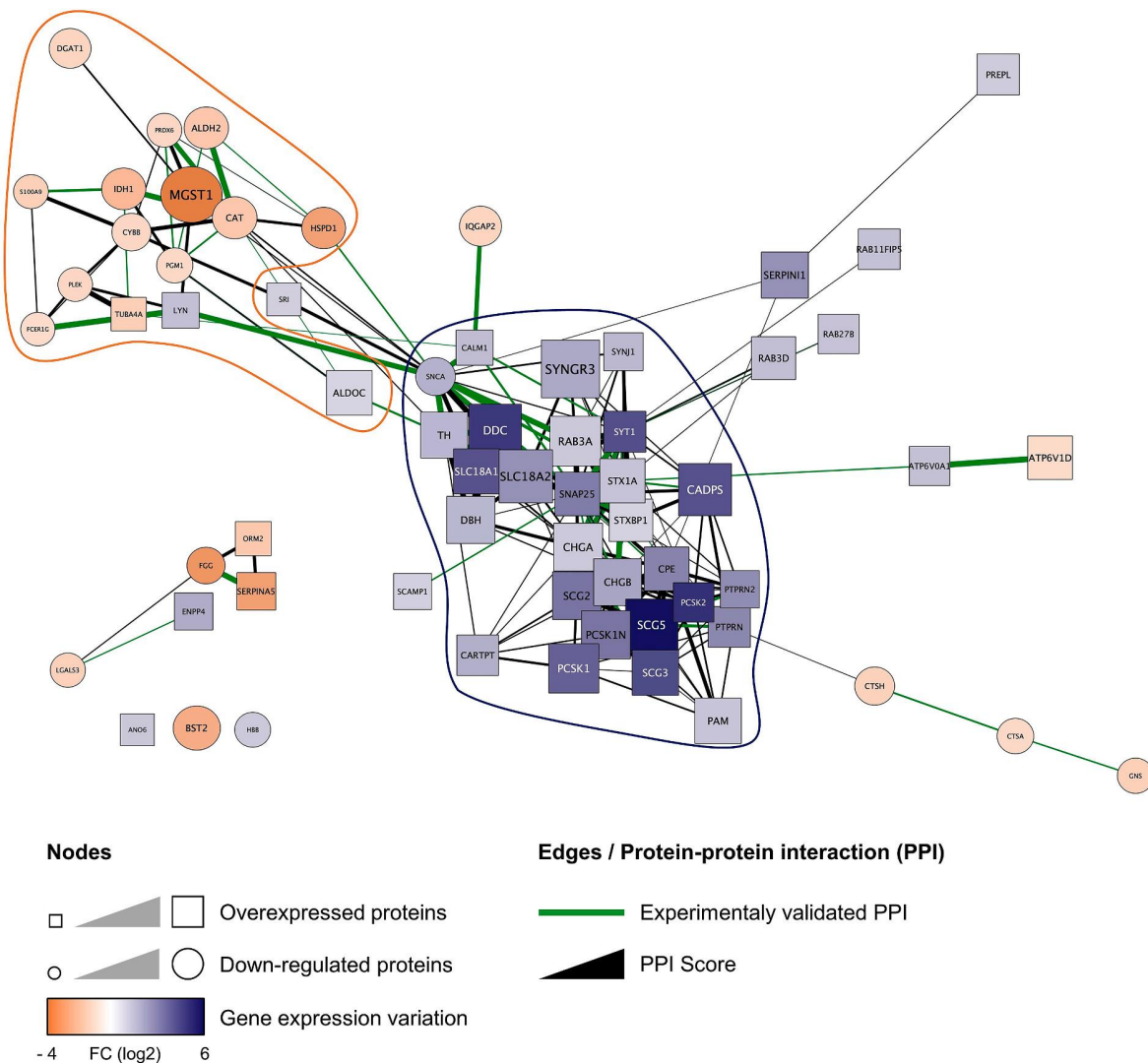
**Fig. 6. Comparison of the proteome dataset with a published gene expression analysis of 60 Pheos and 6 normal adrenal medulla tissues.** (A) Unsupervised hierarchical clustering of selected gene expression profiles (n = 64) for 6 non-tumor adrenal medulla (in white) and 60 Pheo (in black) tissues from Lopez-Jimenez *et al.* (2010). The color scale illustrates the relative level of gene expression: blue, highly expressed gene; red, low expressed gene. (B–C) A significant positive correlation was evidenced between the fold change (FC) of genes and corresponding cytosolic (B;  $\rho = 0.767$ ,  $p = 3.24 \times 10^{-10}$ ) or membrane (C;  $\rho = 0.672$ ,  $p = 4.12 \times 10^{-7}$ ) proteins of the exocytosis pathway. Linear regression (solid line) and 95% confidence bands (the regions delineated by dotted lines) are shown.



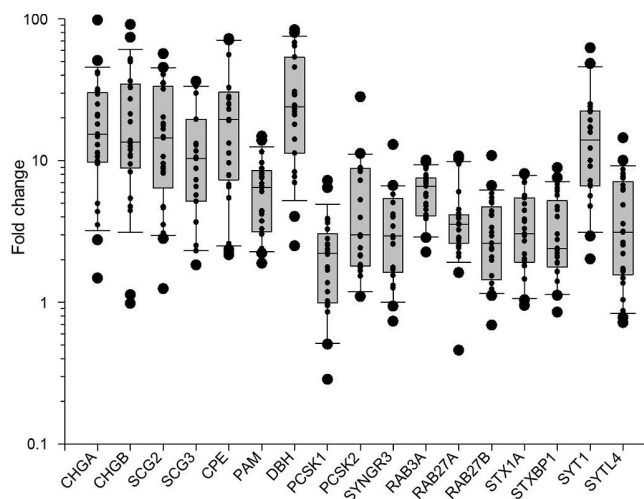
transporters (VMAT) and the passive leakage through the granular bilayer towards the cytoplasm. At the equilibrium, catecholamines remaining in the cytoplasm are either deaminated by the monoamine oxidase (MAO) or transformed in metanephrines by the catechol-O-methyltransferase (COMT; for a review see Ref. [41]). Accordingly, we also observed a large increase of the vesicular monoamine transporters VMAT1 and 2 expression level in Pheo tissues, whereas MAO1 and 2 were down-regulated, the latter favoring the increase of cellular metanephrines synthesis by COMT [38,42,43]. However, it remained unclear to us whether increasing the number of copy of VMAT at the surface of a single granule will necessarily increase its catecholamine content.

Here we have analyzed one by one a total of 7344 individual amperometric spikes from Pheo cells. One amperometric spike represents the release of a single secretory granule and the spike quantal size (Charge; Q) is directly proportional to the amount of catecholamines contained within this granule [13,22]. Note that it is unlikely that part of the overexpressed monoamine transporters would be miss-targeted to

the vesicles involved in constitutive exocytosis as we never observed any spontaneous amperometric spike in the absence of cell stimulation (data not shown). Interestingly, we observed that the average spike charge in Pheo cells did not increase compared to non-tumor cells, and it even slightly decreased for 9 tumors. These results suggest that each single secretory granule in Pheo cells does not contain more catecholamines than in non-tumor cells. In consequence, the best hypothesis to link an excessive cellular catecholamine production with a higher expression of monoamine transporters (along with others granular proteins), but without enhanced granule filling would be an overall increase of the number of secretory granules in Pheo cells. Accordingly, various specific soluble cargos of secretory granules, like different chromogranins or enzymes involved in hormone processing or granule biogenesis, were also found to be overexpressed (Fig. 5D and Supplementary Table 2), in line with previous reports indicating that chromogranins or chromogranin-derived peptides are highly expressed in Pheo [44]. Probing this hypothesis requires however, further investigations and we have started to collect new human samples to address this question in



**Fig. 7. Protein-protein interaction (PPI) network analysis of the exocytic proteins modulated in Pheos at the transcriptomic and protein level.** The PPI network was generated using Cytoscape. Up- and down-regulated proteins are represented by square and round nodes, respectively and the level of protein expression is proportional to their size whereas the mRNA expression variation is color coded as indicated. Therefore, blue squares and red circles represent candidates for which both protein and mRNA are overexpressed or down-regulated, respectively. The 2 first clusters identified by the CytoCluster plugin are outlined in orange ( $p > 10^{-9}$ ) and red ( $p = 3.01 \times 10^{-6}$ ). Note that the variation observed at the protein and mRNA level goes in the same direction for 58 proteins out of 64 (91%), FC: fold change.



**Fig. 8. Global variation of key exocytic proteins expression in human Pheo tissues.** Expression variation of the indicated proteins was quantified at the protein level by MRM-MS in 25 Pheos normalized to their matched adjacent non-tumor tissues. Box- and whisker diagrams illustrate the distribution of protein expression fold change for the 25 Pheos.

the future through electron microscopy imaging.

Importantly, our analysis by carbon fiber amperometry allowed us to demonstrate that the total number of spikes per cell is significantly increased in Pheo cells compared to non-tumor cells. It indicates that, upon similar stimulation, more exocytic events occurs, which led to more catecholamine secretion at the single cell level. Moreover, by analyzing the spike kinetics, we have also observed that, for many patients, these exocytic events tend to be faster. Altogether, these data demonstrated that calcium-regulated exocytosis is highly perturbed in tumor cells, and that the increased number of cells due to the tumor proliferation cannot be responsible alone for the hypersecretion phenotype.

The specific step of the exocytic pathway and which proteins might be involved in this amplified secretory activity remain to be explored in details. However, a significant increase in spike frequency can be consistent with an increase in efficiency of the different steps upstream of the fusion process including recruitment, docking and priming or with a greater calcium sensitivity of the exocytosis machinery. Through the differential mass spectrometry analysis, we have identified several proteins involved in the regulation of these various steps of exocytosis, that are significantly overexpressed in the tumor tissue compared to the non-tumor tissue. Among them, some are known to affect the amperometric spike frequency and/or the kinetics of the spikes when their expression changes in chromaffin cells. This is the case for example of SNARE proteins (SNAP25, Syntaxin-1), as well as for proteins regulating the SNARE complex (Synaptotagmin-1 and -7) or for the actin cytoskeleton organization (Rab27A or Annexin-A2) [45–48].

Fusion pore dynamics is controlled by the competition between fusion pore expansion mechanisms and dynamin-mediated fusion pore closure mechanisms [49] and by specific lipids generated at the exocytotic sites [50]. Faster kinetics of the exocytotic events in tumor cells might be due to a facilitation of the fusion pore expansion which is known to be controlled either by actin-dependent membrane tension [51] and/or by polyunsaturated forms of phosphatidic acid [20]. Whether any of these two pathways is altered in Pheos remains an open question that deserves an in-depth investigation.

Of note, among the core exocytotic machinery, the calcium sensor Synaptotagmin-1 was found to be among the most overexpressed in tumor cells (Fig. 8), which could lead to an increase in calcium sensitivity and probability of release. Note that we did not find any expression change for membrane calcium channels.

To conclude, we have reported here that calcium-regulated exocytosis is deregulated in human Pheo cells and we have described tumor-associated expression changes of various key players of the exocytic pathway. The next challenge will be to understand how exactly these changes lead to the hypersecretion of catecholamines by the tumors. Moreover, a key unmet need is to find molecules able to prevent the catecholamine hypersecretion directly from the tumor cells. Of note, we have recently identified the somatostatin analog pasireotide (SOM230) as a *bona fide* inhibitor of Pheo hypersecretion [52], but the probable mechanism of action of this drug involves an inhibition of the nicotinic stimulation, which may prove to affect the activity of a large variety of secretory cells possessing nicotinic receptors. There is therefore a need to correct hypersecretion by identifying specific alterations in the secretory machinery whose potential candidates are identified in this study.

#### Ethics approval and consent to participate

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

#### Author contribution

Sebastien Houy: Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Validation, Writing (review & editing). Laura Streit: Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Validation, Writing (review & editing). Inès Drissa: Investigation, Formal analysis. Marion Rame: Investigation, Formal analysis. Charles Decraene: Investigation, Formal analysis. Sophie Moog: Investigation, Formal analysis. Laurent Brunaud: Supervision, Resources, Funding acquisition, Methodology. Joël Lanoix: Investigation, Formal analysis. Rabie Chelbi: Investigation, Formal analysis. Florence Bihain: Resources, Methodology. Stéphanie Lacomme: Investigation, Formal analysis, Data curation, Validation. Sandra Lomazzi: Investigation, Formal analysis, Data curation, Validation. Philippe Campoli: Investigation, Formal analysis. Michel Vix: Resources, Methodology. Didier Mutter: Resources, Methodology. Eustache Paramithiotis: Conceptualization, Validation, Funding acquisition, Project administration. Christophe Dubessy: Conceptualization, Validation, Formal analysis. Nicolas Vitale: Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Validation, Writing (review & editing). Stéphane Ory: Conceptualization, Supervision, Validation, Writing (review & editing). Stéphane Gasman: Conceptualization, Supervision, Validation, Funding acquisition, Project administration, Writing (original and review).

#### Declaration of competing interest

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

#### Funding and Acknowledgements

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

a fellowship from la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM; FDM201806005916) to SM. INSERM is providing salary to SG and NV.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215765>.

## References

- [1] W.T. Zandee, K. Kamp, R.C. van Adrichem, R.A. Feelders, W.W. de Herder, Effect of hormone secretory syndromes on neuroendocrine tumor prognosis, *Endocr. Relat. Cancer* 24 (2017) R261–R274.
- [2] A. Anantharam, A.J.B. Kreutzberger, Unraveling the mechanisms of calcium-dependent secretion, *J. Gen. Physiol.* 151 (2019) 417–434.
- [3] R.D. Burgoyne, A. Morgan, Secretory granule exocytosis, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 581–632.
- [4] T. Lang, R. Jahn, Core Proteins of the Secretory Machinery, *Handb Exp Pharmacol*, 2008, pp. 107–127.
- [5] M.F. Bader, R.W. Holz, K. Kumakura, N. Vitale, Exocytosis: the chromaffin cell as a model system, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 971 (2002) 178–183.
- [6] S. Gasman, N. Vitale, Lipid remodelling in neuroendocrine secretion, *Biol. Cell.* 109 (2017) 381–390.
- [7] M. Malacombe, M.F. Bader, S. Gasman, Exocytosis in neuroendocrine cells: new tasks for actin, *Biochim. Biophys. Acta* 1763 (2006) 1175–1183.
- [8] J.W.M. Lenders, M.N. Kerstens, L. Amar, A. Prejbisz, M. Robledo, D. Taieb, K. Pacak, J. Crona, T. Zelinka, M. Mannelli, T. Deutschbein, H. Timmers, F. Castinetti, H. Dralle, J. Widimsky, A.P. Gimenez-Roqueplo, G. Eisenhofer, Genetics, diagnosis, management and future directions of research of pheochromocytoma and paraganglioma: a position statement and consensus of the Working Group on Endocrine Hypertension of the European Society of Hypertension, *J. Hypertens.* 38 (2020) 1443–1456.
- [9] J.M. Pappachan, N.N. Tun, G. Arunagirinathan, R. Sodi, F.W.F. Hanna, Pheochromocytomas and hypertension, *Curr. Hypertens. Rep.* 20 (2018) 3.
- [10] M. Pourian, D.B. Mostafazadeh, A. Soltani, Does this patient have pheochromocytoma? A systematic review of clinical signs and symptoms, *J. Diabetes Metab. Disord.* 15 (2015) 11.
- [11] R. Zhang, D. Gupta, S.G. Albert, Pheochromocytoma as a reversible cause of cardiomyopathy: analysis and review of the literature, *Int. J. Cardiol.* 249 (2017) 319–323.
- [12] H. Fathali, A.S. Cans, Amperometry methods for monitoring vesicular quantal size and regulation of exocytosis release, *Pflügers Archiv* 470 (2018) 125–134.
- [13] E.V. Mosharov, D. Sulzer, Analysis of exocytotic events recorded by amperometry, *Nat. Methods* 2 (2005) 651–658.
- [14] J.W. Lenders, Q.Y. Duh, G. Eisenhofer, A.P. Gimenez-Roqueplo, S.K. Grebe, M. H. Murad, M. Naruse, K. Pacak, W.F. Young Jr., S. Endocrine, Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99 (2014) 1915–1942.
- [15] N.G.S.i.P.S. Group, R.A. Toledo, N. Burnichon, A. Cascon, D.E. Benn, J.P. Bayley, J. Welander, C.M. Tops, H. Firth, T. Dwight, T. Ercolino, M. Mannelli, G. Opocher, R. Clifton-Bligh, O. Gimm, E.R. Maher, M. Robledo, A.P. Gimenez-Roqueplo, P. L. Dahia, Consensus Statement on next-generation-sequencing-based diagnostic testing of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas, *Nat. Rev. Endocrinol.* 13 (2017) 233–247.
- [16] G. Eisenhofer, J.W. Lenders, D.S. Goldstein, M. Mannelli, G. Csako, M.M. Walther, F.M. Brouwers, K. Pacak, Pheochromocytoma catecholamine phenotypes and prediction of tumor size and location by use of plasma free metanephrines, *Clin. Chem.* 51 (2005) 735–744.
- [17] L.D. Thompson, Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score (PASS) to separate benign from malignant neoplasms: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 100 cases, *Am. J. Surg. Pathol.* 26 (2002) 551–566.
- [18] S. Moog, S. Houy, E. Chevalier, S. Ory, G. Weryha, M. Rame, M. Klein, L. Brunaud, S. Gasman, T. Cuny, 18F-FDOPA PET/CT uptake parameters correlate with catecholamine secretion in human pheochromocytomas, *Neuroendocrinology* 107 (2018) 228–236.
- [19] S. Houy, C. Estay-Ahumada, P. Croise, V. Calco, A.M. Haeberle, Y. Bailly, P. Billuart, N. Vitale, M.F. Bader, S. Ory, S. Gasman, Oligophrenin-1 connects exocytotic fusion to compensatory endocytosis in neuroendocrine cells, *J. Neurosci.* 35 (2015) 11045–11055.
- [20] E. Tanguy, P. Coste de Bagneaux, N. Kassas, M.R. Ammar, Q. Wang, A.M. Haeberle, J. Raheirindratsara, L. Fouillen, P.Y. Renard, M. Montero-Hadjadje, S. Chasserot-Golaz, S. Ory, S. Gasman, M.F. Bader, N. Vitale, Mono- and poly-unsaturated phosphatidic acid regulate distinct steps of regulated exocytosis in neuroendocrine cells, *Cell Rep.* 32 (2020), 108026.
- [21] F. Segura, M.A. Brioso, J.F. Gomez, J.D. Machado, R. Borges, Automatic analysis for amperometrical recordings of exocytosis, *J. Neurosci. Methods* 103 (2000) 151–156.
- [22] D.J. Keating, Amperometry in single cells and tissue, *Methods Mol. Biol.* 2233 (2021) 223–231.
- [23] E. Lopez-Jimenez, G. Gomez-Lopez, L.J. Leandro-Garcia, I. Munoz, F. Schiavi, C. Montero-Conde, A.A. de Cubas, R. Ramirez, I. Landa, S. Leskela, A. Maliszewska, L. Inglada-Perez, L. de la Vega, C. Rodriguez-Antona, R. Leton, C. Bernal, J.M. de Campos, C. Diez-Tascon, M.F. Fraga, C. Boullosa, D.G. Pisano, G. Opocher, M. Robledo, A. Cascon, Research resource: transcriptional profiling reveals different pseudohypoxic signatures in SDHB and VHL-related pheochromocytomas, *Mol. Endocrinol.* 24 (2010) 2382–2391.
- [24] P. Shannon, A. Markiel, O. Ozier, N.S. Baliga, J.T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, T. Ideker, Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks, *Genome Res.* 13 (2003) 2498–2504.
- [25] D. Szklarczyk, A.L. Gable, K.C. Nastou, D. Lyon, R. Kirsch, S. Pyysalo, N. T. Doncheva, M. Legeay, T. Fang, P. Bork, L.J. Jensen, C. von Mering, The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets, *Nucleic Acids Res.* 49 (2021) D605–D612.
- [26] P. Croise, S. Houy, M. Gand, J. Lanoix, V. Calco, P. Toth, L. Brunaud, S. Lomazzi, E. Paramithiotis, D. Chelsky, S. Ory, S. Gasman, Cdc42 and Rac1 activity is reduced in human pheochromocytoma and correlates with FARP1 and ARHGGEF1 expression, *Endocr. Relat. Cancer* 23 (2016) 281–293.
- [27] H. Keshishian, T. Addona, M. Burgess, E. Kuhn, S.A. Carr, Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution, *Mol. Cell. Proteomics* 6 (2007) 2212–2229.
- [28] M.W. Onaitis, P.M. Kirshbom, T.Z. Hayward, F.J. Quayle, J.M. Feldman, H. F. Seigler, D.S. Tyler, Gastrointestinal carcinoids: characterization by site of origin and hormone production, *Ann. Surg.* 232 (2000) 549–556.
- [29] R. Dineen, P.M. Stewart, M. Sherlock, Acromegaly, *QJM* 110 (2017) 411–420.
- [30] S. Y-Hassan, H. Falhammar, Cardiovascular manifestations and complications of pheochromocytomas and paragangliomas, *J. Clin. Med.* 9 (2020) 2435.
- [31] R.L. Brown, T. Muzzafar, R. Wollman, R.E. Weiss, A pituitary carcinoma secreting TSH and prolactin: a non-secreting adenoma gone awry, *Eur. J. Endocrinol.* 154 (2006) 639–643.
- [32] T. Daems, J. Verhelst, A. Michotte, P. Abrams, D. De Ridder, R. Abs, Modification of hormonal secretion in clinically silent pituitary adenomas, *Pituitary* 12 (2009) 80–86.
- [33] C.C. Juhlin, S. Skoglund, L. Juntti-Berggren, M. Karlberg, J. Calissendorff, Non-functioning neuroendocrine pancreatic tumors transforming to malignant insulinomas - four cases and review of the literature, *Neuroendocrinol. Lett.* 40 (2019) 175–183.
- [34] F. Tutttita, D.N. Carney, J. Mulshine, T.W. Moody, J. Fedorko, A. Fischler, J. D. Minna, Autocrine growth factors in human small cell lung cancer, *Cancer Surv.* 4 (1985) 707–727.
- [35] P. Song, H.S. Sekhon, Y. Jia, J.A. Keller, J.K. Blusztajn, G.P. Mark, E.R. Spindel, Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma, *Cancer Res.* 63 (2003) 214–221.
- [36] G. Eisenhofer, T.T. Huynh, A. Elkahloun, J.C. Morris, G. Bratslavsky, W. M. Linehan, Z. Zhuang, B.M. Balgley, C.S. Lee, M. Mannelli, J.W. Lenders, S. R. Bornstein, K. Pacak, Differential expression of the regulated catecholamine secretory pathway in different hereditary forms of pheochromocytoma, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295 (2008) E1223–E1233.
- [37] G. Eisenhofer, T.T. Huynh, M. Hiroi, K. Pacak, Understanding catecholamine metabolism as a guide to the biochemical diagnosis of pheochromocytoma, *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2 (2001) 297–311.
- [38] E. Grouzmann, M. Matter, S. Bilz, A. Herren, F. Triponez, C. Henzen, K.S. Kim, H. Zulewski, T. Buclin, N. Brakch, K. Abid, Monoamine oxidase A down-regulation contributes to high metanephrine concentration in pheochromocytoma, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97 (2012) 2773–2781.
- [39] K. Isobe, T. Nakai, N. Yukimasa, T. Nanmoku, K. Takekoshi, F. Nomura, Expression of mRNA coding for four catecholamine-synthesizing enzymes in human adrenal pheochromocytomas, *Eur. J. Endocrinol.* 138 (1998) 383–387.
- [40] B. Jarrott, W.J. Louis, Abnormalities in enzymes involved in catecholamine synthesis and catabolism in pheochromocytoma, *Clin. Sci. Mol. Med.* 53 (1977) 529–535.
- [41] G. Eisenhofer, I.J. Kopin, D.S. Goldstein, Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine, *Pharmacol. Rev.* 56 (2004) 331–349.
- [42] J.W. Lenders, G. Eisenhofer, N.G. Abelung, W. Berger, D.L. Murphy, C.H. Konings, L.M. Wagemakers, I.J. Kopin, F. Karoum, A.H. van Gennip, H.G. Brunner, Specific genetic deficiencies of the A and B isoenzymes of monoamine oxidase are characterized by distinct neurochemical and clinical phenotypes, *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 1010–1019.
- [43] A. Saveanu, M. Muresan, C. De Micco, D. Taieb, A.L. Germanetti, F. Sebag, J. F. Henry, L. Brunaud, A. Enjalbert, G. Weryha, A. Barlier, Expression of somatostatin receptors, dopamine D(2) receptors, noradrenaline transporters, and vesicular monoamine transporters in 52 pheochromocytoma and paragangliomas, *Endocr. Relat. Cancer* 18 (2011) 287–300.
- [44] M. Guerin, J. Guillemot, E. Thouennon, A. Pierre, F.Z. El-Yamani, M. Montero-Hadjadje, C. Dubessy, R. Magoul, I. Lihmann, Y. Anouar, L. Yon, Granins and their derived peptides in normal and tumoral chromaffin tissue: implications for the diagnosis and prognosis of pheochromocytoma, *Regul. Pept.* 165 (2010) 21–29.
- [45] C. Desnos, J.S. Schonn, S. Huet, V.S. Tran, A. El-Amraoui, G. Raposo, I. Fanget, C. Chapuis, G. Menasche, G. de Saint Basile, C. Petit, S. Cribier, J.P. Henry, F. Darchen, Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites, *J. Cell Biol.* 163 (2003) 559–570.
- [46] Q. Fang, K. Berberian, L.W. Gong, I. Hafez, J.B. Sorensen, M. Lindau, The role of the C terminus of the SNARE protein SNAP-25 in fusion pore opening and a model for fusion pore mechanics, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 15388–15392.
- [47] M. Gabel, F. Delavoie, V. Demais, C. Royer, Y. Bailly, N. Vitale, M.F. Bader, S. Chasserot-Golaz, Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory

- granule docking to the plasma membrane and exocytosis, *J. Cell Biol.* 210 (2015) 785–800.
- [48] B. Tawfik, J.S. Martins, S. Houy, C. Imig, P.S. Pinheiro, S.M. Wojcik, N. Brose, B. H. Cooper, J.B. Sorensen, Synaptotagmin-7 places dense-core vesicles at the cell membrane to promote Munc13-2- and Ca(2+)-dependent priming, *Elife* 10 (2021) e64527.
- [49] W.D. Zhao, E. Hamid, W. Shin, P.J. Wen, E.S. Krystofiak, S.A. Villarreal, H. C. Chiang, B. Kachar, L.G. Wu, Hemi-fused structure mediates and controls fusion and fission in live cells, *Nature* 534 (2016) 548–552.
- [50] E. Tanguy, O. Carmon, Q. Wang, L. Jeandel, S. Chasserot-Golaz, M. Montero-Hadjadje, N. Vitale, Lipids implicated in the journey of a secretory granule: from biogenesis to fusion, *J. Neurochem.* 137 (2016) 904–912.
- [51] W. Shin, L. Ge, G. Arpino, S.A. Villarreal, E. Hamid, H. Liu, W.D. Zhao, P.J. Wen, H. C. Chiang, L.G. Wu, Visualization of membrane pore in live cells reveals a dynamic-pore theory governing fusion and endocytosis, *Cell* 173 (2018) 934–945 e12.
- [52] L. Streit, S. Moog, S. Hugel, M. Rame, E. Tanguy, V. Andry, H.A. Schmid, L. Brunaud, F. Bihain, C. Nomine-Criqui, Y. Goumon, S. Lacomme, S. Lomazzi, M. Vix, D. Mutter, N. Vitale, S. Ory, S. Gasman, Somatostatin Analogue Pasireotide (SOM230) Inhibits Catecholamine Secretion in Human Pheochromocytoma Cells, *Cancer Lett* 524 (2022) 232–244.

**Supplementary Table 1: Clinical, biochemical, and functional characteristics of the 27 patients with Pheo evaluated in this study.**

#	Age	Gender	Hormonal-related symptoms	Hormonal hypersecretion phenotype	Urinary MN (ULN ratio)	Urinary NMN (ULN ratio)	Plasma free MN (ULN ratio)	Plasma free NMN (ULN ratio)	Plasma CGA (ULN ratio)	Size (cm)	Ki-67 (%)	PASS	Genetics
1	46	M	No	AD	8.1	1.2	-	-	4.9	3.7	-	3	Spor
2	54	F	No	AD	2.1	0.9	6.0	2.0	0.5	2.0	1	0	NF1
3	50	M	Yes	AD	13.5	3.1	10.0	2.0	1.5	3.5	-	1	NF1
4	34	M	Yes	NAD	0.5	7.1	1.0	3.0	4.8	1.7	4	1	SDHD
5	75	F	No	AD	14.1	4.7	-	-	4.6	8.0	-	3	Spor
6	61	M	Yes	NAD	1.5	2.0	2.0	10.0	-	2.5	-	3	Spor
7	64	M	No	AD	6.5	5.5	5.3	5.0	-	4.2	1	4	Spor
8	43	F	Yes	NAD	0.4	16.5	1.0	26.0	3.6	5.0	-	4	Spor
9	30	M	No	NAD	0.3	6.6	0.1	4.4	3.1	5.5	3	1	SDHB
10	47	M	Yes	NAD	1.0	8.7	-	-	-	4.0	-	2	-
11	47	F	Yes	AD	38.6	3.7	3.4	2.0	-	6.5	1	6	NF1
12	58	M	Yes	AD	1.9	4.6	-	-	0.9	4.4	5	0	-
13	36	F	Yes	AD	6.6	7.9	10.3	10.0	3.4	5.0	2	2	-
14	50	M	Yes	AD	18.0	5.2	-	-	-	7.0	1	2	Spor
15	42	M	Yes	NAD	2.0	13.0	0.1	5.6	1.5	4.0	-	0	-
16	47	F	Yes	NAD	4.6	23.4	-	-	1.2	7.0	1	0	Spor
17	58	F	Yes	AD	-	-	1.9	2.5	-	-	-	1	NF1
18	62	M	Yes	AD	54.1	9.6	-	-	-	4.5	-	0	-
19	46	M	Yes	NAD	0.9	12.5	0.8	8.3	10.1	5.0	-	3	RET
20	58	F	Yes	AD	2.8	10.4	4.4	7.4	-	3.5	1	4	-
21	53	F	No	AD	-	-	2.7	1.3	-	2.5	4	4	Spor
22	45	M	Yes	AD	-	-	18.9	2.2	-	4.2	0	2	Spor
1P	62	F	Yes	NAD	1.5	18.6	1.0	1.0	-	5.0	-	-	Spor
2P	48	F	Yes	AD	10.0	5.0	-	-	-	3.5	-	-	-
3P	58	M	Yes	AD	1.3	1.6	5.0	5.0	2.7	8.0	1	0	Spor
4P	52	F	Yes	AD					6.8	5.0	7	9	Spor
6P	69	M	Yes	AD	2.0	2.0	-	-	-	3.0	2	0	-

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

*Samples from patients 1 to 22 were used for carbon fiber amperometry whereas samples from patients 1P, 2P, 3P, 4P, 6P were used for mass spectrometry analysis. Note that tumor tissues used for mass spectrometry did not present necrosis, inflammatory infiltrates or hemorrhage. Four contained >90% (1P, 2P, 3P, 4P) and one 80% (6P) of tumor cells.*

**Supplementary Table 2: List of up- and down-regulated proteins in Pheos by comparison with the adjacent non-tumor tissues.**

Gene	Protein	Entry (UniProtKB)	Fraction	Fold change	adj-p value	Functions in exocytosis	References
SYNGR3	Synaptogyrin-3	O43761	Membrane	17.72	0.00018	Neurotransmitter uptake, regulation of dopamine transporter activity	Uniprot
MMRN1	Multimerin-1	Q13201	Cytosol	15.94	0.00016	Unclear role in exocytosis	Uniprot
DDC	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase	P20711	Cytosol	13.84	0.00033	Catecholamine metabolic process, dopamine biosynthetic process	Uniprot
SLC18A2	Synaptic vesicular amine transporter	Q05940	Membrane	12.02	0.00050	Monoamine transport	Uniprot
SERPINE2	Glia-derived nexin	P07093	Cytosol	11.29	0.00335	Secretory granule organization and biogenesis, regulation of synaptic transmission	Uniprot, PMID: 16319172
CADPS	Calcium-dependent secretion activator 1	Q9ULU8	Cytosol	11.25	0.00016	Priming, fusion, calcium binding, plasma membrane binding	Uniprot
SCG5	Neuroendocrine protein 7B2	P05408	Cytosol	10.59	0.00016	Regulation of pituitary hormone secretion, peptide hormone processing	Uniprot
DBH	Dopamine beta-hydroxylase	P09172	Cytosol	10.09	0.00103	Adrenaline and noradrenaline synthesis pathway	Uniprot
CHGA	Chromogranin-A	P10645	Cytosol	9.92	0.00090	Granule biogenesis, secretory granule organization, peptide hormone processing	Uniprot
SERPINI1	Neuroserpin	Q99574	Cytosol	9.57	0.00103	Peptide hormone processing	Uniprot
RAB3A	Ras-related protein Rab-3A	P20336	Cytosol	9.45	0.00039	Synaptic vesicle maturation, priming, docking, trafficking, recycling	Uniprot
PCSK1	Neuroendocrine convertase 1	P29120	Membrane	9.36	0.00050	Peptide hormone processing	Uniprot
SCG3	Secretogranin-3	Q8WXD2	Cytosol	9.19	0.00040	Granule biogenesis, peptide hormone processing	Uniprot, PMID: 29281094
RAB3A	Ras-related protein Rab-3A	P20336	Membrane	9.09	0.00043	Synaptic vesicle maturation, priming, docking, trafficking, recycling	Uniprot
CHGB	Secretogranin-1	P05060	Cytosol	8.79	0.00036	Secretory granule biogenesis and organization, peptide hormone processing	Uniprot, PMID: 12902350, PMID: 14996840

PCSK1N	ProSAAS	Q9UHG2	Membrane	8.72	0.00137	Peptide hormone processing	Uniprot
DDC	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase	P20711	Membrane	8.68	0.00050	Catecholamine metabolic process, dopamine biosynthetic process	Uniprot
SCG2	Secretogranin-2	P13521	Cytosol	8.56	0.00034	Granule biogenesis, peptide hormone processing	Uniprot
TH	Tyrosine 3-monooxygenase	P07101	Cytosol	8.42	0.00136	Dopamine biosynthetic process, fatty acid metabolic process	Uniprot
PCSK1	Neuroendocrine convertase 1	P29120	Cytosol	8.29	0.00041	Peptide hormone processing	Uniprot
SV2B	Synaptic vesicle glycoprotein 2B	Q7L1I2	Membrane	7.90	0.00427	Binds synaptotagmin 1, calcium regulator, neurotransmitter transport	Uniprot, PMID: 19176798, PMID: 15466855
RAB3D	Ras-related protein Rab-3D	O95716	Membrane	7.61	0.00059	Vesicle trafficking, docking	Uniprot
PCSK1N	ProSAAS	Q9UHG2	Cytosol	7.44	0.00087	Peptide hormone processing	Uniprot
GAL	Galanin peptides	P22466	Cytosol	7.39	0.00413	Inhibits exocytosis, peptide hormone processing	Uniprot, PMID: 9614355
SCG2	Secretogranin-2	P13521	Membrane	7.19	0.00075	Granule biogenesis, peptide hormone processing	Uniprot
PAM	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	P19021	Membrane	7.02	0.00049	Regulation of actin cytoskeleton organization, fatty acid biosynthetic process	Uniprot
PSAP	Prosaposin	P07602	Cytosol	6.63	0.00174	Lipid binding, GM1 binding, regulation of lipid metabolism	Uniprot
SYTL4	Synaptotagmin-like protein 4	Q96C24	Cytosol	6.58	0.00026	Docking, calcium binding, plasma membrane binding, phospholipid binding, SNARE binding	Uniprot, PMID: 27032672
SLC18A1	Chromaffin granule amine transporter	P54219	Membrane	6.27	0.00116	Monoamine transport	Uniprot
NAPB	Beta-soluble NSF attachment protein	Q9H115	Membrane	6.26	0.00050	SNARE binding, SNARE complex disassembly, vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus	Uniprot
SNAP25	Synaptosomal-associated protein 25	P60880	Cytosol	6.17	0.00089	Vesicle docking, priming, fusion, SNARE binding	Uniprot
CPE	Carboxypeptidase E	P16870	Cytosol	6.14	0.00145	Peptide hormone processing, directs prohormones to the regulated secretory pathway	Uniprot

ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C	P09972	Cytosol	6.05	0.00090	Cytoskeleton binding protein	Uniprot
TIMP1	Metalloproteinase inhibitor 1	P01033	Cytosol	6.03	0.00271	Unclear role in exocytosis	Uniprot
CHGA	Chromogranin-A	P10645	Membrane	6.02	0.00381	Granule biogenesis, secretory granule organization, peptide hormone processing	Uniprot
SYT1	Synaptotagmin-1	P21579	Cytosol	5.93	0.00104	Vesicle docking, priming, calcium binding, plasma membrane binding, SNARE binding, endocytosis, vesicle mediated transport	Uniprot, PMID: 33823763
PAM	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	P19021	Cytosol	5.91	0.00051	Regulation of actin cytoskeleton organization, fatty acid biosynthetic process	Uniprot
STX1A	Syntaxin-1A	Q16623	Membrane	5.88	0.00050	Vesicle docking, priming, fusion, endocytosis, SNARE binding, SNARE complex assembly	Uniprot
STXBP1	Syntaxin-binding protein 1	P61764	Cytosol	5.85	0.00034	Vesicle maturation, docking, priming, fusion, SNARE binding, SNARE complex assembly, Munc13 binding	Uniprot, PMID: 32643828
CHGB	Secretogranin-1	P05060	Membrane	5.81	0.00077	Secretory granule biogenesis and organization, peptide hormone processing	Uniprot, PMID: 12902350, PMID: 14996840
ATP6AP2	Renin receptor	O75787	Membrane	5.80	0.00161	V-type ATPase (v-ATPase) assembly and acidification of the lysosome	Uniprot
SYP	Synaptophysin	P08247	Membrane	5.78	0.0091	Regulation of neuronal synaptic plasticity, regulation of synaptic vesicle exocytosis, endocytosis, synaptic vesicle maturation and membrane organization	Uniprot
TH	Tyrosine 3-monooxygenase	P07101	Membrane	5.58	0.00192	Dopamine biosynthetic process, fatty acid metabolic process	Uniprot
ATP6V1D	V-type proton ATPase subunit D	Q9Y5K8	Membrane	5.50	0.00075	Proton-transporting ATPase activity, acidification of intracellular compartments	Uniprot
CTSZ	Cathepsin-Z	Q9UBR2	Cytosol	5.49	0.01285	Unclear role in exocytosis	Uniprot



PCSK2	Neuroendocrine convertase 2	P16519	Cytosol	5.41	0.00578	Peptide hormone processing	Uniprot
B2M	Beta-2-microglobulin	P61769	Cytosol	5.33	0.00089	Unclear role in exocytosis	Uniprot
CADPS2	Calcium-dependent secretion activator 2	Q86UW7	Cytosol	5.27	0.00041	Priming, calcium binding, plasma membrane binding, SNARE binding	Uniprot, PMID: 18022372, PMID: 19805029
PTPRN	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase-like N	Q16849	Cytosol	5.26	0.00145	Secretory granule maturation and mobility	Uniprot
PRCP	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	P42785	Cytosol	5.17	0.00290	Peptide hormone processing	Uniprot
DBH	Dopamine beta-hydroxylase	P09172	Membrane	5.08	0.00136	Adrenaline and noradrenaline synthesis pathway	Uniprot
CPE	Carboxypeptidase E	P16870	Membrane	5.07	0.00239	Peptide hormone processing, directs prohormones to the regulated secretory pathway	Uniprot
SNAP25	Synaptosomal-associated protein 25	P60880	Membrane	5.06	0.00076	Vesicle docking, priming, fusion, SNARE binding	Uniprot
RAPGEF4	Rap guanine nucleotide exchange factor 4	Q8WZA2	Cytosol	5.03	0.00115	cAMP dependent-PKA independant exocytosis	Uniprot
NFASC	Neurofascin	O94856	Membrane	4.85	0.00069	Synapse organization, neurite extension	Uniprot
ECM1	Extracellular matrix protein 1	Q16610	Cytosol	4.70	0.00639	Platelet degranulation (unclear role in exocytosis)	Uniprot
RAB27A	Ras-related protein Rab-27A	P51159	Cytosol	4.62	0.00231	Interacts with granuphilin to regulate exocytosis, regulates endocytic pathway, granule maturation, docking, priming	Uniprot, PMID: 17052176, PMID: 21148308, PMID: 34483204, PMID: 31474712
CST3	Cystatin-C	P01034	Cytosol	4.58	0.00315	Neutrophil degranulation (unclear role in exocytosis)	Uniprot
SYT2	Synaptotagmin-2	Q8N9I0	Membrane	4.56	0.01268	Calcium binding, plasma membrane binding, SNARE binding, vesicle-mediated transport, fusion, synaptic vesicle endocytosis	Uniprot, PMID: 34421537

CD44	CD44 antigen	P16070	Membrane	4.55	0.00066	Assembles via its cytoplasmic domain a protein complex including RhoA, Rac1, Rho-kinases and phospholipase C, calcium mobilization, actin reorganization	Uniprot
PREPL	Prolyl endopeptidase-like	Q4J6C6	Cytosol	4.52	0.00075	Regulates synaptic vesicle exocytosis	Uniprot
SMPD1	Sphingomyelin phosphodiesterase	P17405	Cytosol	4.46	0.00089	Glycosphingolipid metabolic process, cholesterol metabolic process, regulation of endocytosis	Uniprot
CD63	CD63 antigen	P08962	Membrane	4.41	0.00198	Reorganization of actin cytoskeleton, vesicular transport	Uniprot
RAB11FIP5	Rab11 family-interacting protein 5	Q9BXF6	Cytosol	4.34	0.00340	Protein trafficking from apical recycling endosomes to the apical plasma membrane, V-ATPase regulation	Uniprot
CARTPT	Cocaine- and amphetamine-regulated transcript protein	Q16568	Cytosol	4.33	0.00924	Insulin secretion regulation	Uniprot
SERPINI1	Neuroserpin	Q99574	Membrane	4.32	0.00137	Peptide hormone processing	Uniprot
QPCT	Glutaminy-peptide cyclotransferase	Q16769	Membrane	4.27	0.03997	Neutrophil degranulation (unclear role in exocytosis)	Uniprot
STXBP1	Syntaxin-binding protein 1	P61764	Membrane	4.27	0.00113	Vesicle maturation, docking, priming, fusion, SNARE binding, SNARE complex assembly, Munc13 binding	Uniprot, PMID: 32643828
SYTL4	Synaptotagmin-like protein 4	Q96C24	Membrane	4.25	0.00095	Docking, calcium binding, plasma membrane binding, phospholipid binding, SNARE binding	Uniprot, PMID: 27032672
NAPB	Beta-soluble NSF attachment protein	Q9H115	Cytosol	4.21	0.00194	SNARE binding, SNARE complex disassembly, vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus	Uniprot
ATP8A1	Phospholipid-transporting ATPase IA	Q9Y2Q0	Membrane	4.20	0.00076	Lipid reorganization of the plasma membrane	Uniprot
RAB3B	Ras-related protein Rab-3B	P20337	Cytosol	4.13	0.01969	Vesicle trafficking, vesicle biogenesis, regulates vesicle docking, priming, vesicle size, synaptic vesicle cycle	Uniprot, PMID: 20716109

SYNGR1	Synaptogyrin-1	O43759	Membrane	4.02	0.00286	Synaptic vesicle membrane organization, regulation of synaptic plasticity, inhibits exocytosis	Uniprot, PMID: 10383386
RAB27B	Ras-related protein Rab-27B	O00194	Membrane	4.00	0.00136	Anterograde axonal protein transport, endocytosis, exosome secretion regulation, multivesicular endosomes docking, regulation of the number and secretion of platelet dense granules, delivery of granules near the exocytic site	Uniprot, PMID: 19966785, PMID: 17384153, PMID: 17761531
RAB3B	Ras-related protein Rab-3B	P20337	Membrane	3.97	0.00233	Vesicle trafficking, vesicle biogenesis, regulates vesicle docking, priming, vesicle size, synaptic vesicle cycle	Uniprot, PMID: 20716109
RAB27B	Ras-related protein Rab-27B	O00194	Cytosol	3.96	0.00067	Anterograde axonal protein transport, endocytosis, exosome secretion regulation, multivesicular endosomes docking, regulation of the number and secretion of platelet dense granules, delivery of granules near the exocytic site	Uniprot, PMID: 19966785, PMID: 17384153, PMID: 17761531
SRP14	Signal recognition particle 14 kDa protein	P37108	Cytosol	3.92	0.00141	Unclear role in exocytosis	Uniprot
SYT7	Synaptotagmin-7	O43581	Membrane	3.88	0.00500	Priming, calcium binding, plasma membrane binding, SNARE binding	Uniprot, PMID: 33749593
ATP6V0A1	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a1	Q93050	Membrane	3.87	0.00135	Vesicle acidification	Uniprot
SCG3	Secretogranin-3	Q8WXD2	Membrane	3.86	0.00331	Granule biogenesis, peptide hormone processing	Uniprot, PMID: 29281094
GAL	Galanin peptides	P22466	Membrane	3.77	0.03071	Inhibits exocytosis, peptide hormone processing	Uniprot, PMID: 9614355
PTPRN	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase-like N	Q16849	Membrane	3.61	0.00305	Secretory granule maturation and mobility	Uniprot
AMPD3	AMP deaminase 3	Q01432	Cytosol	3.59	0.00320	Unclear role in exocytosis	Uniprot
RAB4A	Ras-related protein Rab-4A	P20338	Cytosol	3.58	0.00149	Vesicle trafficking, docking, regulates endocytosis	Uniprot, PMID: 10698684
DNM1L	Dynamin-1-like protein	O00429	Membrane	3.55	0.00137	Fusion, endocytosis, lipid binding	Uniprot

SERPINE2	Glia-derived nexin	P07093	Membrane	3.50	0.00662	Secretory granule organization and biogenesis, regulation of synaptic transmission	Uniprot, PMID: 16319172
SYNJ1	Synaptojanin-1	O43426	Cytosol	3.49	0.00399	Regulation of lipid composition of the plasma membrane, synaptic vesicle priming, transport, endocytosis	Uniprot
TOLLIP	Toll-interacting protein	Q9H0E2	Membrane	3.47	0.00204	Autophagy (unclear role in exocytosis)	Uniprot
PTPRN2	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase N2	Q92932	Membrane	3.38	0.00137	Lipid metabolic process, required for normal accumulation of secretory vesicles, neurotransmitter secretion, insulin secretion	Uniprot
SERPINA5	Plasma serine protease inhibitor	P05154	Cytosol	3.36	0.01310	Unclear role in exocytosis	Uniprot
PFN2	Profilin-2	P35080	Cytosol	3.33	0.00163	Actin reorganization, lipid metabolism	Uniprot
ENPP4	Bis(5'-adenosyl)-triphosphatase ENPP4	Q9Y6X5	Membrane	3.24	0.00449	Unclear role in exocytosis	Uniprot
ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	P04075	Cytosol	3.22	0.00584	Actin filament organization (unclear role in exocytosis)	Uniprot
TUBB4B	Tubulin beta-4B chain	P68371	Membrane	3.16	0.00164	Microtubule cytoskeleton organization	Uniprot
RAB3D	Ras-related protein Rab-3D	O95716	Cytosol	3.10	0.00301	Vesicle trafficking, docking	Uniprot
DYNC1H1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	Q14204	Membrane	3.09	0.00201	Vesicle transport, positive regulation of intracellular transport, retrograde axonal transport	Uniprot
TUBB	Tubulin beta chain	P07437	Membrane	3.09	0.00243	Cytoskeleton-dependent intracellular transport, microtubule cytoskeleton organization, regulation of synapse organization	Uniprot
SYT1	Synaptotagmin-1	P21579	Membrane	3.08	0.00386	Vesicle docking, priming, calcium binding, plasma membrane binding, SNARE binding, endocytosis, vesicle mediated transport	Uniprot, PMID: 33823763

SCAMP1	Secretory carrier-associated membrane protein 1	O15126	Membrane	3.08	0.00388	Protein transport, fusion pore opening and closure, endocytosis	Uniprot, PMID: 21272170, PMID: 10551807, PMID: 18171723, PMID: 10777571
DYNC1LI1	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	Q9Y6G9	Membrane	3.07	0.00220	Vesicle transporter, microtubule cytoskeleton organization	Uniprot
APP	Amyloid-beta precursor protein	P05067	Cytosol	3.04	0.00251	Interacts with synaptic release machinery, endocytosis, synapse organization	Uniprot
TOM1	Target of Myb protein 1	O60784	Cytosol	2.98	0.00293	Intracellular trafficking, endocytosis	Uniprot
CD9	CD9 antigen	P21926	Membrane	2.95	0.00831	Sperm-egg fusion	Uniprot, PMID: 18728192
RPH3A	Rabphilin-3A	Q9Y2J0	Membrane	2.93	0.03797	Docking, priming, fusion	Uniprot, PMID: 16763567
PPP3CB	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit beta isoform	P16298	Cytosol	2.87	0.00228	Regulation of insulin secretion, calcium-ion regulated exocytosis, endocytosis	Uniprot
LYN	Tyrosine-protein kinase Lyn	P07948	Membrane	2.87	0.00386	Platelet and mast cell degranulation (unclear role in exocytosis)	Uniprot
DYNC1H1	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	Q14204	Cytosol	2.83	0.00233	Vesicle transport, positive regulation of intracellular transport, retrograde axonal transport	Uniprot
CALM1	Calmodulin-1	P0DP23	Cytosol	2.82	0.00301	Vesicle trafficking, priming, fusion	PMID: 34421537
VAMP3	Vesicle-associated membrane protein 3	Q15836	Membrane	2.80	0.00332	Vesicle docking, fusion, SNARE complex assembly, vesicular transport from the late endosomes to the trans-Golgi network	Uniprot
SDF4	45 kDa calcium-binding protein	Q9BRK5	Membrane	2.79	0.01404	Zymogen granule exocytosis	Uniprot
MYO5A	Unconventional myosin-Va	Q9Y4I1	Membrane	2.76	0.00731	Vesicle transport, actin filament organization	Uniprot
TOLLIP	Toll-interacting protein	Q9H0E2	Cytosol	2.75	0.00446	Autophagy (Unclear role in exocytosis)	Uniprot
SNAPIN	SNARE-associated protein Snapin	O95295	Cytosol	2.72	0.00307	Vesicle trafficking, maturation, priming, fusion, SNARE binding	Uniprot

APP	Amyloid-beta precursor protein	P05067	Membrane	2.67	0.00311	Interacts with synaptic release machinery, endocytosis, synapse organization	Uniprot
GARS	Glycine--tRNA ligase	P41250	Cytosol	2.65	0.00332	Unclear role in exocytosis	Uniprot
TUBA4A	Tubulin alpha-4A chain	P68366	Membrane	2.63	0.01056	Microtubule cytoskeleton organization	Uniprot
CLU	Clusterin	P10909	Membrane	2.61	0.00736	Positive regulation of receptor-mediated endocytosis	Uniprot
ORM2	Alpha-1-acid glycoprotein 2	P19652	Cytosol	2.58	0.00440	Lipid reorganization	PMID: 27312128
SDF4	45 kDa calcium-binding protein	Q9BRK5	Cytosol	2.57	0.00877	Zymogen granule exocytosis	Uniprot
PCSK2	Neuroendocrine convertase 2	P16519	Membrane	2.55	0.02773	Peptide hormone processing	Uniprot
FAM3C	Protein FAM3C	Q92520	Membrane	2.52	0.01201	Interacts with SNAP23 and RalA (unclear role in exocytosis)	PMID: 22939629
SERPINF2	Alpha-2-antiplasmin	P08697	Cytosol	2.48	0.00378	Unclear role in exocytosis	Uniprot
DBNL	Drebrin-like protein	Q9UJU6	Membrane	2.48	0.00462	Actin cytoskeleton organization, endocytosis	Uniprot
CTSZ	Cathepsin-Z	Q9UBR2	Membrane	2.43	0.01022	Unclear role in exocytosis	Uniprot
DNAJC3	DnaJ homolog subfamily C member 3	Q13217	Membrane	2.41	0.00880	Unclear role in exocytosis	Uniprot
PFN2	Profilin-2	P35080	Membrane	2.41	0.00569	Actin reorganization, lipid metabolism	Uniprot
VAT1	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	Q99536	Cytosol	2.37	0.01795	Calcium binding (unclear role in exocytosis)	Uniprot
RAB27A	Ras-related protein Rab-27A	P51159	Membrane	2.36	0.01470	Interacts with granuphilin to regulate exocytosis, regulates endocytic pathway, granule maturation, docking, priming	Uniprot, PMID: 17052176, PMID: 21148308, PMID: 34483204, PMID: 31474712
RAB3GAP1	Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit	Q15042	Cytosol	2.36	0.01642	Positive regulation of glutamate neurotransmitter secretion	Uniprot
PFKL	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type	P17858	Cytosol	2.33	0.01501	Insulin secretion regulation	Uniprot
TIMP1	Metalloproteinase inhibitor 1	P01033	Membrane	2.33	0.04521	Unclear role in exocytosis	Uniprot
SRI	Sorcin	P30626	Cytosol	2.29	0.01565	Insulin secretion regulation, calcium binding protein	Uniprot

SEPT5	Septin-5	Q99719	Cytosol	2.27	0.00802	Cytoskeleton reorganization	Uniprot
LGALS3BP	Galectin-3-binding protein	Q08380	Cytosol	2.25	0.01028	Unclear role in exocytosis	Uniprot
TUBA4A	Tubulin alpha-4A chain	P68366	Cytosol	2.25	0.02017	Microtubule cytoskeleton organization	Uniprot
MIF	Macrophage migration inhibitory factor	P14174	Cytosol	2.24	0.02151	Unclear role in exocytosis	Uniprot
TUBB	Tubulin beta chain	P07437	Cytosol	2.21	0.01572	Cytoskeleton-dependent intracellular transport, microtubule cytoskeleton organization, regulation of synapse organization	Uniprot
ENDOD1	Endonuclease domain-containing 1 protein	O94919	Membrane	2.20	0.01953	Unclear role in exocytosis	Uniprot
PNP	Purine nucleoside phosphorylase	P00491	Cytosol	2.20	0.01009	Unclear role in exocytosis	Uniprot
ACTR1B	Beta-centractin	P42025	Membrane	2.17	0.01056	Cytoskeleton organization, microtubule based vesicle motility	Uniprot
ANO6	Anoctamin-6	Q4KMQ2	Membrane	2.17	0.01947	Plasma membrane phospholipid scrambling, lipid reorganization of the plasma membrane	Uniprot
TRAPPC1	Trafficking protein particle complex subunit 1	Q9Y5R8	Cytosol	2.16	0.04291	Endoplasmic reticulum to Golgi vesicle-mediated transport	Uniprot
AP2A2	AP-2 complex subunit alpha-2	O94973	Membrane	2.10	0.01217	Clathrin-dependent endocytosis, protein transport, lipid binding	Uniprot
DNM1L	Dynamin-1-like protein	O00429	Cytosol	2.09	0.01299	Fusion, endocytosis, lipid binding	Uniprot
MAN2B1	Lysosomal alpha-mannosidase	O00754	Cytosol	2.01	0.01332	Unclear role in exocytosis	Uniprot
A2M	Alpha-2-macroglobulin	P01023	Cytosol	-2.03	0.01478	Unclear role in exocytosis	Uniprot
STXBP3	Syntaxin-binding protein 3	O00186	Membrane	-2.06	0.01323	Docking, fusion, SNARE binding	Uniprot
APRT	Adenine phosphoribosyltransferase	P07741	Cytosol	-2.06	0.01507	Unclear role in exocytosis	Uniprot
DERA	Deoxyribose-phosphate aldolase	Q9Y315	Membrane	-2.07	0.02014	Unclear role in exocytosis	Uniprot
VAPA	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	Q9P0L0	Membrane	-2.08	0.02654	Endoplasmic reticulum to Golgi vesicle-mediated transport, phospholipid transport, membrane fusion	Uniprot

FGA	Fibrinogen alpha chain	P02671	Cytosol	-2.09	0.03711	Unclear role in exocytosis	Uniprot
PTGES2	Prostaglandin E synthase 2	Q9H7Z7	Cytosol	-2.14	0.00915	Lipid metabolic process	Uniprot
VCL	Vinculin	P18206	Cytosol	-2.15	0.01566	Actin filament binding protein, cytoskeleton reorganization	Uniprot
THBS1	Thrombospondin-1	P07996	Cytosol	-2.16	0.02546	Unclear role in exocytosis	Uniprot
SCCPDH	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	Q8NBX0	Membrane	-2.21	0.01198	Unclear role in exocytosis	Uniprot
ANXA2	Annexin A2	P07355	Membrane	-2.23	0.02400	Calcium-dependent protein binding, calcium-dependent phospholipid binding, cytoskeleton reorganization, vesicle fusion, vesicle budding from membrane, regulation of receptor-mediated endocytosis	Uniprot
FCER1G	High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma	P30273	Membrane	-2.23	0.00763	Unclear role in exocytosis	Uniprot
FGA	Fibrinogen alpha chain	P02671	Membrane	-2.26	0.02179	Unclear role in exocytosis	Uniprot
PRDX6	Peroxioredoxin-6	P30041	Cytosol	-2.28	0.00786	Glycerophospholipid catabolic process	Uniprot
PLEK	Pleckstrin	P08567	Cytosol	-2.29	0.03768	Actin cytoskeleton reorganization, regulation of inositol phosphate biosynthetic process, docking	Uniprot
HBB	Hemoglobin subunit beta	P68871	Membrane	-2.34	0.01042	Unclear role in exocytosis	Uniprot
S100A9	Protein S100-A9	P06702	Cytosol	-2.35	0.00924	Calcium binding, regulation of cytoskeleton organization, degranulation of neutrophils	Uniprot
PROS1	Vitamin K-dependent protein S	P07225	Membrane	-2.36	0.03700	Calcium binding (unclear role in exocytosis)	Uniprot
SLIRP	SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial	Q9GZT3	Cytosol	-2.37	0.02528	Unclear role in exocytosis	Uniprot
PRDX6	Peroxioredoxin-6	P30041	Membrane	-2.37	0.00880	Glycerophospholipid catabolic process	Uniprot
LGALS3	Galectin-3	P17931	Cytosol	-2.40	0.01781	Endocytosis	Uniprot
NIT2	Omega-amidase NIT2	Q9NQR4	Cytosol	-2.43	0.00548	Unclear role in exocytosis	Uniprot
ELANE	Neutrophil elastase	P08246	Membrane	-2.43	0.02242	Unclear role in exocytosis	Uniprot



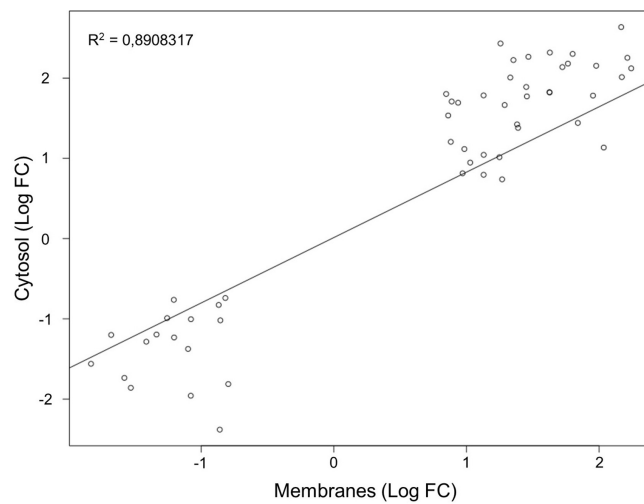
CYBA	Cytochrome b-245 light chain	P13498	Membrane	-2.48	0.02766	Unclear role in exocytosis	Uniprot
STOM	Stomatin	P27105	Membrane	-2.52	0.00533	Lipid raft component	Uniprot
RNPEP	Aminopeptidase B	Q9H4A4	Cytosol	-2.54	0.00389	Unclear role in exocytosis	Uniprot
GLA	Alpha-galactosidase A	P06280	Cytosol	-2.59	0.03945	Glycerophospholipid catabolic process, glycosphingolipid catabolic process	Uniprot
S100A13	Protein S100-A13	Q99584	Membrane	-2.60	0.04494	Calcium binding, lipid binding, mast cell degranulation	Uniprot
PGM1	Phosphoglucomutase-1	P36871	Cytosol	-2.64	0.00315	Unclear role in exocytosis	Uniprot
LAMTOR1	Ragulator complex protein LAMTOR1	Q6IAA8	Cytosol	-2.65	0.00603	Late endosomes and lysosomes biogenesis, may play a role in RhoA activation	Uniprot
GNS	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	P15586	Membrane	-2.67	0.03261	Calcium binding (unclear role in exocytosis)	Uniprot
FGG	Fibrinogen gamma chain	P02679	Cytosol	-2.69	0.01811	Induce exocytosis of Weibel-Palade bodies in endothelial cells	PMID: 19193866
FGB	Fibrinogen beta chain	P02675	Cytosol	-2.72	0.02085	Induce exocytosis of Weibel-Palade bodies in endothelial cells	PMID: 19193866
CTSA	Lysosomal protective protein	P10619	Cytosol	-2.73	0.04395	Unclear role in exocytosis	Uniprot
HBB	Hemoglobin subunit beta	P68871	Cytosol	-2.76	0.00349	Unclear role in exocytosis	Uniprot
METTL7A	Methyltransferase-like protein 7A	Q9H8H3	Membrane	-2.82	0.01175	Unclear role in exocytosis	Uniprot
APOOL	MICOS complex subunit MIC27	Q6UXV4	Membrane	-2.85	0.01445	Unclear role in exocytosis	Uniprot
DLD	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	P09622	Cytosol	-2.87	0.00574	Unclear role in exocytosis	Uniprot
FGB	Fibrinogen beta chain	P02675	Membrane	-2.93	0.01206	Induce exocytosis of Weibel-Palade bodies in endothelial cells	PMID: 19193866
HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	Membrane	-2.93	0.00580	Acrosomal exocytosis	PMID: 18276932
ACAA1	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal	P09110	Membrane	-2.99	0.00305	Lipid metabolism	Uniprot
STX7	Syntaxin-7	O15400	Cytosol	-3.10	0.00905	Protein trafficking from plasma membrane to endosomes, homotypic fusion of endocytic organelles, SNARE binding, vesicle docking, vesicle fusion	Uniprot

ITGA2B	Integrin alpha-IIb	P08514	Membrane	-3.17	0.00290	Platelet degranulation (unclear role in exocytosis)	Uniprot
CTSD	Cathepsin-D	P07339	Membrane	-3.17	0.02030	Unclear role in exocytosis	Uniprot
COMMD3	COMM domain-containing protein 3	Q9UBI1	Cytosol	-3.19	0.00751	Phosphoinositides regulation	PMID: 31537807
F13A1	Coagulation factor XIII A chain	P00488	Cytosol	-3.29	0.01539	Calcium binding (unclear role in exocytosis)	Uniprot
PPBP	Platelet basic protein	P02775	Cytosol	-3.31	0.00348	Unclear role in exocytosis	Uniprot
GLB1	Beta-galactosidase	P16278	Membrane	-3.32	0.01990	Glycosphingolipid metabolic process	Uniprot
PTGES2	Prostaglandin E synthase 2	Q9H7Z7	Membrane	-3.33	0.00219	Lipid metabolic process	Uniprot
ANXA11	Annexin A11	P50995	Membrane	-3.35	0.00743	Vesicular trafficking from the endoplasmic reticulum to Golgi, calcium binding, lipid binding	Uniprot, PMID: 25540196
SYPL1	Synaptophysin-like protein 1	Q16563	Membrane	-3.36	0.00318	Chemical synaptic transmission	Uniprot
CYBB	Cytochrome b-245 heavy chain	P04839	Membrane	-3.40	0.00825	Unclear role in exocytosis	Uniprot
GLB1	Beta-galactosidase	P16278	Cytosol	-3.42	0.00759	Glycosphingolipid metabolic process	Uniprot
FN1	Fibronectin	P02751	Membrane	-3.42	0.00157	Unclear role in exocytosis	Uniprot
FGG	Fibrinogen gamma chain	P02679	Membrane	-3.50	0.00445	Induce exocytosis of Weibel-Palade bodies in endothelial cells	PMID: 19193866
SNCA	Alpha-synuclein	P37840	Cytosol	-3.54	0.00338	Synaptic vesicle trafficking, priming, fusion, dilation of exocytotic fusion pores, calcium regulation, SNARE binding, endocytosis, phospholipid metabolic process	Uniprot
FLNA	Filamin-A	P21333	Cytosol	-3.60	0.00118	Actin cytoskeleton reorganization, regulation of actin filament bundle assembly, synapse organization	Uniprot
CTSH	Pro-cathepsin H	P09668	Cytosol	-3.62	0.00312	Unclear role in exocytosis	Uniprot
CREG1	Protein CREG1	O75629	Cytosol	-3.63	0.00275	Unclear role in exocytosis	Uniprot
MAOB	Amine oxidase [flavin-containing] B	P27338	Membrane	-3.78	0.00700	Dopamine catabolic process, neurotransmitter catabolic process	Uniprot
F13A1	Coagulation factor XIII A chain	P00488	Membrane	-3.79	0.00168	Calcium binding (unclear role in exocytosis)	Uniprot
ACAA1	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal	P09110	Cytosol	-3.94	0.00584	Lipid metabolism	Uniprot

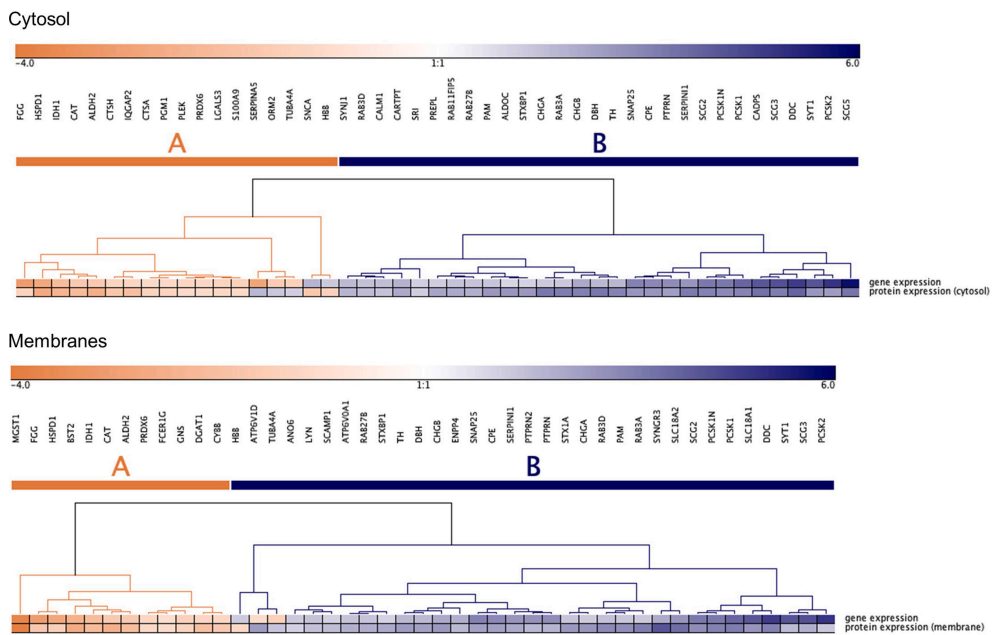
FLNA	Filamin-A	P21333	Membrane	-4.09	0.00175	Actin cytoskeleton reorganization, regulation of actin filament bundle assembly, synapse organization	Uniprot
DGAT1	Diacylglycerol O-acyltransferase 1	O75907	Membrane	-4.26	0.00164	Diacylglycerol metabolic process, triglyceride biosynthetic process	Uniprot
SULT1A3	Sulfotransferase 1A3	P0DMM9	Cytosol	-4.30	0.00080	Dopamine catabolic process	Uniprot
IQGAP2	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	Q13576	Cytosol	-4.37	0.00163	Regulation of actin cytoskeleton organization, binds to activated Cdc42 and Rac1, associate with calmodulin	Uniprot
ALDH2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	P05091	Membrane	-4.60	0.00174	Dopamine biosynthetic process, serotonin biosynthetic process	Uniprot
CD109	CD109 antigen	Q6YHK3	Cytosol	-4.64	0.00175	Unclear role in exocytosis	Uniprot
CAT	Catalase	P04040	Cytosol	-4.74	0.00053	Unclear role in exocytosis	Uniprot
IDH1	Isocitrate deshydrogenase	O75874	Membrane	-4.82	0.00136	Regulation of phospholipid biosynthetic and catabolic process	Uniprot
FERMT3	Fermitin family homolog 3	Q86UX7	Cytosol	-5.00	0.00064	Unclear role in exocytosis	Uniprot
CYB5R3	NADH-cytochrome b5 reductase 3	P00387	Cytosol	-5.02	0.00051	Unclear role in exocytosis	Uniprot
PPBP	Platelet basic protein	P02775	Membrane	-5.33	0.00136	Unclear role in exocytosis	Uniprot
MAOA	Amine oxidase [flavin-containing] A	P21397	Membrane	-5.38	0.00159	Dopamine catabolic process, neurotransmitter catabolic process	Uniprot
IDH1	Isocitrate deshydrogenase	O75874	Cytosol	-5.64	0.00051	Regulation of phospholipid biosynthetic and catabolic process	Uniprot
SCCPDH	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	Q8NBX0	Cytosol	-6.09	0.00034	Unclear role in exocytosis	Uniprot
CAT	Catalase	P04040	Membrane	-6.20	0.00049	Unclear role in exocytosis	Uniprot
ALDH2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	P05091	Cytosol	-6.38	0.00068	Dopamine biosynthetic process, serotonin biosynthetic process	Uniprot
BST2	Bone marrow stromal antigen 2	Q10589	Membrane	-6.81	0.00050	Regulation of actin cytoskeleton organization	Uniprot
HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	Cytosol	-7.05	0.00060	Acrosomal exocytosis	PMID: 18276932
COL1A1	Collagen alpha-1(I) chain	P02452	Membrane	-9.00	0.00050	Unclear role in exocytosis	Uniprot
PROS1	Vitamin K-dependent protein S	P07225	Cytosol	-10.73	0.00266	Calcium binding (unclear role in exocytosis)	Uniprot

MGST1	Microsomal glutathione S-transferase 1	P10620	Membrane	-23.19	0.00018	Unclear role in exocytosis	Uniprot
-------	--	--------	----------	--------	---------	----------------------------	---------

*List of proteins involved in exocytosis detected by mass spectrometry in cytosol- and membrane-enriched fractions. The median value of the fold change is obtained by comparing the expression from 5 pairs of Pheos matched to non-tumor tissues. cAMP: cyclic adenosine monophosphate, GM1: monosialotetrahexosylganglioside, PKA: protein kinase A, SNARE: soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor.*



**Supplementary Figure 1: Proteins found in common in the membrane and the cytosolic fractions vary in the same direction.** Among the 175 identified proteins whose expression significantly changes more than 2 fold, 53 are found in both cytosol- and membrane-enriched fractions. Linear regression analysis between the membrane-fold change (FC) and the cytosolic-fold change shows a positive correlation for both down- and up-regulated proteins.



**Supplementary Figure 2: Comparison of genes and proteins of the exocytic pathway deregulated in Pheos.** The 64 common differentially expressed genes (GSE19422) and proteins (this study) are selected. Unsupervised hierarchical clustering highlights two clusters of up- and down-regulated genes and proteins. Except for 5 (A) and 3 (B) genes/proteins, expression of all the genes (top row) and their proteins (bottom row) varies in the same direction. The color scale illustrates the over- (blue) or under- (red) expression of genes and proteins in Pheos compared to non-tumor tissues.



## 2. Identification d'un ensemble de miARN impliqués dans la dérégulation de l'exocytose dans le phéochromocytome

Nous avons mis en évidence un dysfonctionnement de la voie de la sécrétion régulée dans les cellules de phéochromocytome humain. L'augmentation de l'activité d'exocytose de ces cellules est associée à une surexpression globale des gènes de l'exocytose tant au niveau transcriptionnel que protéique. Nous nous interrogeons sur les régulateurs de ce processus et proposons l'hypothèse que les miARN, des régulateurs post-transcriptomiques de l'expression des gènes, sont impliqués dans la régulation des gènes de l'exocytose. Plusieurs études ont montré que l'expression de nombreux miARN est dérégulée dans les cancers humains et globalement diminuée (section 3.6). De plus, la surexpression concomitante de nombreux gènes impliqués dans un même processus biologique suggère que les miARN pourraient en être responsables.

Pour tester cette hypothèse, nous avons d'abord construit ExoDB, un réseau général d'interactions entre les miARN et leurs ARNm cibles impliqués dans l'exocytose. À cet effet, nous avons développé un workflow bio-informatique basé sur l'utilisation de logiciels d'analyse d'interaction (STRING-DB), de prédiction (mirDIP) et de co-expression (oncomiR). Appliqué à des données d'expression des gènes (GSE19422) et des miARN (GSE29742) dans le PCC, cette analyse *in silico* a permis d'établir un sous-réseau ExoDB d'interactions miARN:ARNm impliqué dans la dérégulation de l'exocytose dans le PCC par rapport à la médullosurrénale saine. Afin de valider expérimentalement l'influence des miARN identifiés, nous avons développé un essai luminescent de mesure de l'activité de sécrétion régulée par le calcium des cellules PC12 de phéochromocytome de rat. Nous avons également utilisé une approche par ampérométrie à fibre de carbone afin de mieux comprendre les effets induits par l'un de ces miARN sur l'exocytose. Finalement, plusieurs interactions miARN-ARNm identifiées bio-informatiquement ont été validées par RT-qPCR.

Les résultats obtenus sont exposés dans le manuscrit intitulé « *A set of miRNAs regulates exocytosis in pheochromocytoma, a neuroendocrine tumor* » en préparation pour une soumission, que je signe en premier auteur.

Dans cet article j'ai réalisé l'ensemble des analyses bio-informatiques et expérimentales hormis la validation expérimentale de l'effet de miR-34a-5p par ampérométrie à fibre de carbone. Cette partie a fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe du Dr Stéphane Gasman (INCI, Strasbourg).





# A set of miRNAs regulates exocytosis in pheochromocytoma, a neuroendocrine tumor

Drissa Inès<sup>1</sup>, Streit Laura<sup>2</sup>, Cartier Dorthé<sup>1</sup>, Wolf Alexander<sup>2</sup>, Quillet Aurélien<sup>1</sup>, Yon Laurent<sup>1</sup>, Gasman Stéphane<sup>2</sup>, Anouar Youssef<sup>1</sup>, Dubessy Christophe<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup> Univ. Rouen, INSERM, Normandie Univ., Différenciation et communication neuroendocrine, endocrine et germinale, 76000 Rouen, France

<sup>2</sup> Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 67000 Strasbourg, France

<sup>3</sup> Univ. Rouen, INSERM, CNRS Heracles, 76000 Rouen, France

**Keywords:** exocytosis, microRNA, pheochromocytoma, neuroendocrine tumor, calcium-regulated secretion pathway

## ABSTRACT

Calcium-regulated secretion of hormones and neuropeptides by cells within the neuroendocrine system is essential for regulating vital physiological functions, including metabolism, growth, and reproduction. Pheochromocytomas (PCCs) are rare neuroendocrine tumors of the adrenal medulla gland that secrete high levels of catecholamines into the bloodstream, leading to clinical manifestations such as hypertension. This hypersecretion of catecholamine is due to both tumor burden and dysfunction of exocytosis, the final step of the regulated secretory pathway (RSP). However, the etiology of hypersecretory PCC activity is poorly understood. Several studies suggest that miRNAs, as post-transcriptional inhibitors, play a role in the control of the RSP. To investigate this possibility, we first built ExoDB, a general network of interactions between miRNAs and their target mRNAs involved in exocytosis. To do this, we developed a bioinformatics approach that combines the use of prediction and co-expression software. Applied to miRNA and gene differentially expressed in human PCC, we were able to identify an ExoDB subnetwork in which 31 miRNAs and 41 genes, involved in the exocytosis process, are deregulated in PCC compared to the normal adrenal medulla. To determine the regulatory capacity of these miRNAs, we developed a secretion assay based on a luminescent reporter (*hGH1-Nluc*) specifically expressed in the dense-core secretory vesicles of the rat PCC-derived PC12 cell line (PC12-2luc). Thus, under resting and stimulated ( $\text{Ba}^{2+}$ ) conditions, we observed that 20 of these 31 rat miRNAs inhibited secretion (-30% to -71%) following their transfection. Moreover, these miRNAs fall into 3 functional groups (resting and/or stimulated), suggesting that they regulate different stages of exocytosis. Several miRNA:mRNA interactions were experimentally validated at transcriptomic level (RT-qPCR), corroborating the inhibitory effects of miRNAs on exocytosis. To better understand the role played by these miRNAs on exocytosis, we then studied miR-34a-5p, one of the most connected miRNAs in the ExoDB network, using carbon fiber amperometry on bovine chromaffin cells in primary culture. Overexpression of *bta*-miR-34a-5p inhibited the number of exocytic events and slow down their kinetics (-34%). This study represents the first large-scale investigation of the involvement of miRNAs in the regulation of exocytosis, and more specifically in PCC. These findings therefore provide a solid basis for a better understanding of the dysregulation of secretion mechanisms in neuroendocrine tumors such as PCC.

## INTRODUCTION

Exocytosis, the final step in the process of regulated secretion, allows the neuroendocrine system to secrete hormones and neuropeptides essential to the control of vital functions in the body, such as metabolism, growth, and reproduction. This capacity also confers on it the role of orchestrating an adaptive pattern of body energy distribution under stressful conditions. Notably, the chromaffin cells in the adrenal medulla mediate the "fight or flight" response by secreting catecholamines, which modulate blood pressure (Cannon & de la Paz, 1911).

In neuroendocrine cells, hormones and neuropeptides are internalized in secretory granules. Transported to the plasma membrane, these granules are tethered, docked, and ultimately exocytosed through a calcium-dependent process at the plasma membrane, allowing for the release of their contents into the extracellular space (Sudhof & Rizo, 2011). This process of exocytosis, well-described for decades, is characterized by the involvement of the *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors* (SNARE) multiprotein complex, consisting of the proteins Stx1, Snap25, and Vamp2, which associate to form a bundle of helices that bring vesicular and membrane membranes into close contact and induce their fusion (Rizo, 2022). Exocytosis is finely controlled through coordinated action of a set of chaperone proteins and other regulators in the active zone, allowing for vesicle targeting to the plasma membrane, stabilization of the SNARE complex, and calcium sensing (Sharma et al., 2011; Tobaben et al., 2001). Questions arise regarding regulations of this essential process, particularly post-transcriptional regulation of these proteins.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs, approximately 22 nucleotides in length, that fine-tune gene expression at the post-transcriptional level. This inhibitory regulation involves binding of a 6-nucleotide "seed" sequence at the 5' end of the miRNA, primarily in the *3' untranslated region* (UTR) of target mRNAs. This interaction, typically imperfect, leads to translational repression and, to a lesser extent, mRNA degradation (Bartel, 2004). Due to the small size of miRNAs and their seed sequence, paired regulatory sites can easily emerge in the 3' UTR regions (Farh et al., 2005; Stark et al., 2005). On average, about 400 targets are conserved per miRNA family (Friedman et al., 2009). Thus, the dense layer of post-transcriptional control added by miRNAs complements and extends regulation occurring at other levels of the expression program for over 60% of protein-coding genes. It appears challenging for any biological process to escape the influence of this complex and conserved network of regulation. In this regard, it is now well-established that all multicellular eukaryotic

organisms use miRNAs to regulate fundamental cellular functions such as proliferation, differentiation, and apoptosis, making them fine regulators of homeostasis.

Neuroendocrine tumors are often associated with dysregulation of hormonal secretion, leading to deleterious clinical repercussions that must be considered for optimal patient management. However, the cellular and molecular origins of this phenomenon are not well understood. PCC, a rare neuroendocrine tumor that originates from chromaffin cells of the adrenal medulla, is characterized by the overproduction of catecholamines, mainly hypersecretion, which can induce major symptoms and clinical complications (Zandee et al., 2017). Using human PCC samples, we have recently demonstrated that these cells exhibit increased secretion activity, in addition to the tumor mass effect (Houy et al., 2022). Through single-cell approaches using carbon fiber amperometry, we have identified an elevated number of exocytotic events in these cells. Furthermore, the transcriptional and protein levels of 64 major genes involved in the exocytotic process are found to be overexpressed. Given that miRNA expression is generally found to be underexpressed in cancers, we hypothesize that dysregulation of their expression in PCC is responsible for the overexpression of exocytosis-related genes and, ultimately, for the increased exocytosis activity leading to catecholamine hypersecretion.

## MATERIALS AND METHODS

### Construction of a miRNA:mRNA network involved in exocytosis

Fifty gene lists were compiled by querying Gene Ontology, KEGG, Reactome, and Uniprot databases using keywords such as 'exocytosis', 'exocytic', 'secretion', 'fusion', and 'release' through the STRING DB tool (v.11.0, <https://string-db.org>) (Figure 1) (Szkarczyk et al., 2019). These lists were then imported into Excel (16.77.1., Microsoft, Redmond, USA). Using the 'pivot table' function, we tabulated the number of times each gene was cited and multiple entries were removed. The list was then organized according to the number of citations, and genes with 20 or more citations were selected. We then carried out an extensive literature review to assess the potential involvement of the remaining genes in exocytosis. The list of selected genes was then uploaded into the STRING DB tool (organism: Homo sapiens, minimum required interaction score: medium confidence (0.4)). We then performed a protein-protein interaction (PPI) network analysis using STRING DB's default parameters and exported the correlation scores to and visualize the data using Cytoscape (v.3.10.1) (Shannon et al., 2003). We let the network self-organize on the basis of the correlation score using the "edge-weighted spring-embedded layout" parameter.

Next, we submitted the list of genes into the mirDIP tool (v. 4.1, <https://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>) to predict the miRNAs that potentially regulate them (minimum score: high) (Figure 1) (Tokar et al., 2018). We repeated this process for the oncomiR tool (all cancers, significance threshold:  $p \leq 0.05$ , mirDB score threshold: 0). We then developed a script for R (4.0.1.) to keep only interactions common to miRDIP and oncomiR, and whose miRNAs are highly conserved (data collected from miRBase v.22.0, <https://mirbase.org/>) (Kozomara et al., 2019). Experimentally validated interactions, we obtained from the DIANA-TarBase tool (v.8.0, <https://dianalab.e-ce.uth.gr/html/diana/web/index.php?r=tarbasev8/index>, validation type: direct) after submitting the list of exocytosis-related gene (Karagkouni et al., 2018). Finally, we visualized these data using Cytoscape (v.3.10.1). We let the network self-organize on the basis of the oncomiR co-expression score using the "edge-weighted spring-embedded layout" parameter. The network was characterized using Cytoscape's NetworkAnalyzer tool (evaluated parameters: radiality, number of interactions, stress, average shortest path length).

## Transcriptomic analysis

Gene expression data were retrieved from the GSE19422 dataset (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE19422>) (López-Jiménez et al., 2010) which includes 6 normal adrenal medulla and 84 PCC/paragangliomas (Figure 1). Only the 61 PCC samples were used and sample GSM483021 was excluded from our analysis because its transcriptomic profile, revealed by clustering and UMAP analyses, is similar to that of normal samples, suggesting that it is misidentified. The expression level of each gene was calculated as the geometric mean of the significantly differentially expressed probes ( $FC > 1.5$ ,  $p\text{-values} \leq 0.05$ ) identified with the limma algorithm via the GEO2R web tool using a Benjamin-Hochberg FDR correction ( $p\text{-values} \leq 0.05$ ). miRNA expression data were retrieved from the GSE29742 dataset (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE29742>) (De Cubas et al., 2013), which includes 6 normal adrenal medulla and 37 PCCs. Differentially expressed miRNA were identified as for genes ( $FC > 1.5$ ,  $p\text{-values} \leq 0.05$ ).

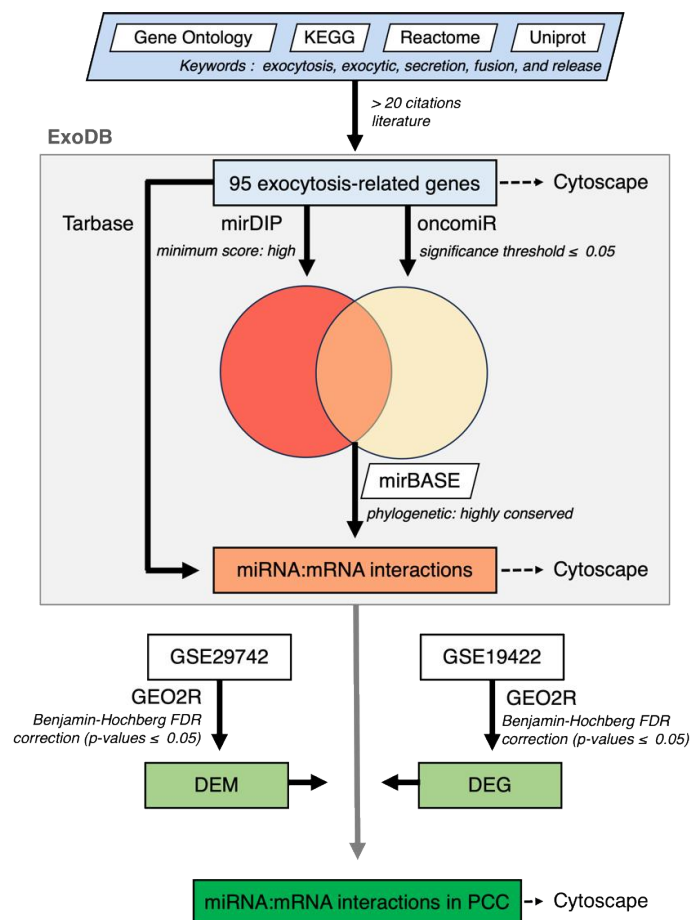


Figure 1 ExoDB workflow

DEM: differentially expressed miRNAs, DEG: differentially expressed genes

### **Cell culture and PC12-2luc cells**

Undifferentiated PC12 cells derived from a rat PCC (ECACC 88022401) were cultivated in DMEM medium supplemented with 5% FCS, 10% horse serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin. Cells were incubated in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Unless otherwise indicated, cell culture reagents were obtained from Sigma–Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France).

The coding sequence of the *human* growth hormone transcript variant 1 (*hGH1*, NM\_000515.4), obtained from NCBI (<https://ncbi.nlm.nih.gov/>) was synthesized and cloned in phase (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) with the nano-luciferase gene (Nluc) in plasmid pNLF1-C (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). One million PC12 cells were transfected by nucleofection according to the suppliers' recommendations (Lonza Biosciences, Basel, Switzerland) with 1 µg of the plasmid expressing the *hGH1*-Nluc construct using the nucleofector V kit and program U-029. The plasmid pGL4.51 (Promega) containing the firefly luciferase (Fluc) gene was also transfected. After one week in normal culture medium, cells were then selected for two weeks using 100 µg/ml hygromycin B (Nluc) and 400 µg/ml geneticin (Fluc) to obtain PC12-2luc stable cell line.

Overexpression of miRNAs was achieved by transfection of synthetic miRNAs (Tableau 1, mirVana miRNA Mimics, Fisher, Courtabœuf, France) using 0.3 µl of Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) per well with a final concentration of 10 nM miRNA mimics. The same protocol was used for transfection of siRNAs (L-093289-02 for Snap25, L-089172-02 for Stx1a, On-TargetPlus, SmartPool, Dharmacon) and a negative control, AllStar (1027280, Qiagen).



Tableau 1 Synthetic miRNAs list

miRBase Accession Number	miRNA name	Assay ID
MIMAT0000776	rno-let-7c-5p	MC10436
MIMAT0000828	rno-miR-124-3p	MC10691
MIMAT0000600	rno-miR-129-5p	MC10195
MIMAT0000836	rno-miR-130a-3p	MC10506
MIMAT0000841	rno-miR-135a-5p	MC11126
MIMAT0000843	rno-miR-137-3p	MC10513
MIMAT0000844	rno-miR-138-5p	MC11727
MIMAT0000845	rno-miR-139-5p	MC12466
MIMAT0035725	rno-miR-148a-3p	MC25134
MIMAT0000855	rno-miR-153-3p	MC10122
MIMAT0000858	rno-miR-181a-5p	MC10421
MIMAT0000859	rno-miR-181b-5p	MC12442
MIMAT0000868	rno-miR-193a-3p	MC11123
MIMAT0035734	rno-miR-193b-3p	MC32123
MIMAT0000869	rno-miR-194-5p	MC10004
MIMAT0000870	rno-miR-195-5p	MC10827
MIMAT0000789	rno-miR-19a-3p	MC10649
MIMAT0003118	rno-miR-215	MC19637
MIMAT0000888	rno-miR-218a-5p	MC10328
MIMAT0000805	rno-miR-30e-5p	MC10037
MIMAT0000811	rno-miR-32-5p	MC12584
MIMAT0000812	rno-miR-33-5p	MC12410
MIMAT0001549	rno-miR-365-3p	MC11133
MIMAT0001619	rno-miR-424-5p	MC11080
MIMAT0017308	rno-miR-455-3p	MC20434
MIMAT0005316	rno-miR-455-5p	MC10529
MIMAT0003383	rno-miR-497-5p	MC11293
MIMAT0000606	rno-miR-7a-5p	MC10047
MIMAT0000818	rno-miR-96-5p	MC10422
MIMAT0000781	rno-miR-9a-5p	MC10022
MIMAT0000268	rno-miR-34a-5p	MC11030

### Quantification of secretory activity in PC12-2luc

PC12-2luc cells were plated at a density of  $8.10^3$  cells per well in a 96-well plate previously treated with 20  $\mu\text{g/ml}$  collagen I. Cells were transfected at 24h and 48h with synthetic miRNA (conditions described above) and incubated for a further 48h. To measure secretion, cells were washed (2 x 5 min) with calcium saline buffer (CaSB, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM HEPES, pH=7.4) heated to 37°C and then stimulated for 30 min at 37°C with 50  $\mu\text{l}$  of barium saline buffer (BaSB, 150 mM NaCl, 5 mM, KCl 2 mM,  $\text{BaCl}_2$ , 10 mM HEPES, pH=7.4). To avoid mechanical stimulation of the cells, the speed of buffer distribution is controlled using an automatic multichannel pipette. The supernatant containing the secreted luminescent reporter is then transferred to a new 96-well plate and the cells are lysed with 50  $\mu\text{l}$  of cell lysis buffer (Ozyme, St-Quentin-en-Yvelines, France). Dual Luciferase nano-glow assay reagent (Promega) is added on 20  $\mu\text{l}$  of each of the 2 extracts (1:1, v/v) in white opaque 384-well plate (Costar, Sigma-Aldrich). Fluc and Nluc activities are revealed by measuring luminescence

intensity for 1 second using a P200 infinite microplate reader (Tecan, Lyon, France). The rate of secretion was calculated by dividing the secreted luciferase signal by the total luciferase content. The Fluc cell content signal was used as stable expression control. For each condition, 8 technical replicates were made, and experiments were independently reproduced six times.

### **Retro-transcription and qPCR analysis**

PC12 cells were plated at a density of  $6.10^4$  cells per well in a 24-well plate. Cells were transfected at 24h and 48h with synthetic miRNA (conditions described above) and incubated for a further 24h. Total RNA was extracted using the Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). RNA quantity and purity measurement were performed using a Nanodrop 2000C spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, France). Thus, 1  $\mu$ g of RNA was reverse-transcribed with the ImProm-II Reverse Transcription system (Promega) according to the supplier's recommendations. Amplification of cDNA, with SYBR Green PCR Mastermix (Thermo Fisher Scientific), was then performed using an Applied Biosystems QuantStudio 12K Flex thermal cycler (Thermo Fisher Scientific) in a final volume of 5  $\mu$ l. Primers, located on different exons rat mRNA sequences, were designed using Primer3Plus software (Tableau 2). They were validated over a linear dynamic range of at least 3 dilution logs according to MIQE recommendations (Bustin et al., 2009). Relative target gene expression was determined with the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method using the geometric mean of GAPDH and PGK mRNA expression as an endogenous control. The stability of expression of these genes was checked with the RefFinder tool (Xie et al., 2023).

Tableau 2 RT-qPCR primers list

gene	forward primer sequence (5' -> 3')	Tm	reverse primer sequence (5' -> 3')	Tm
APBA2	AGACACGCAGGAAACCATGAT	56.8	GGTCTCGATGCAGTCCTGAGA	58.4
BSN	CGCGCCCACGCATATAAG	56.8	TGATACGCTTCACTGTCCGAAA	56.3
CADPS	AAATAGCCAGGGAACGCAAA	55.1	AGCTCCTCGATGTACATATTTTCCA	55.8
LIN7C	GCTGTGAGAGAGGTATACGAACATG	56.8	GCTCTCACTTCAGGGCTGCTA	59.0
MYRIP	GACCATCGCTGGCTTAAACATAG	55.9	TTGTACCTGACTCCTTTGCTTCTG	56.8
NRXN1	TGGACGGTCAGGTACCATTTC	56.7	CAACTCATCATCGAGGCTAGGATCT	57.3
NSF	CAGCAGCTTGTCTTTAGCTTCAAT	55.9	TGGGATCCATGGCTTCGAT	56.3
PPFIA2	CCACTGTTTCGCACATACTCATGT	57.3	CAGTAGTGCACCTTAGGTCGTGTAGAC	58.4
RAB27A	CACCAAACCGGGTAAAGCA	55.7	AGTCTCCCAAGGCCAAAAACTT	57.1
RAB3A	CCACCTGGGCTTTGAGTTCTT	57.6	ACGTTCAAAGGTCTGCTTGACA	57.0
RAB3D	TGGTGATCTTGGTTTTGAGTTCTTC	55.5	CACCTGCTTCACGTTGATGTTT	56.6
RIMBP2	GACCAACAGTAACTACAGCCATATCATC	56.9	CTTGTACCTGGCTGCCTTAC	58.2
RIMS3	GCGACGACACTGGCAACAC	59.1	ATATAGGTGGCTGGGAGGATT	57.4
RIMS4	CAC TGCCAGCTGCCTATATCAA	57.1	TGGTCTTCTTCTTGGCAATGC	55.8
SCAMP1	CCGTTCAAGGACCCATCTGT	57.1	GGCTGGGTGTTGGGTACATT	57.8
SCAMP5	AAGAGTTGTGAGCAGGCTTCCT	58.6	GGATGAATTTGGGCAATGGT	53.7
SNCA	GAAAACAGGAGGAATCAGAGTTCTG	55.5	TGAACACATCCATGGCTAAAGATG	55.4
SNPH	GACCAGTATTACCTCCTCAAATGGA	56.0	CCTGCGTGGAGTGGTTCTCT	59.3
STX1A	AACAAAGTTCGCTCCAAGCTAAAG	56.0	CGTGGAAATGCTGCGTCTTC	56.8
STX4	CCGAGTACCGAGAGAAGACGT	58.1	CCATTCCAGCATTGGTGATCT	55.3
STXBP1	CGTCTGAGAAGTCTGTCCACTCTCT	59.3	GCGGCCCGATATTTAGCA	55.4
STXBP5	TTTCAGTTTGCCGAGCTTGA	55.1	GCTATCCGCATGTTGGTAAGG	55.9
SYN1	TCAGGGAACCTGGAAGACCAATAC	56.3	CAACTTGTACCTGTGACACATAGCAA	56.8
SYN2	CAGGGAACCTGGAAGACAAACT	57.1	GAGCTTGTACCGGTCTGACATG	57.6
SYNGR3	CGTGTCTGGGTGTTTTCTATAGC	57.5	AAGACGCAGCGCAGTTCTG	58.5
SYP	CAGAACAAGTACCGAGAGAATAACAAA	55.0	CGATGAGCTAACTAGCCACATGA	56.5
SYT1	AACCAGCTGTTGGTGGGAATC	57.9	CTTTGACGTATGGATCGGATGTAC	55.2
SYT2	ACCCAGCCTTCAACGAAACTT	57.2	CCAGGGTTTTGCCTCCTAACT	57.1
SYT4	TCTTAAAAGCGCGGCACCTA	57.0	TCTTGGCATGGTACAGGTTTAC	57.2
UNC13A	ACGGGAACCTTAACCCAGTGT	58.5	CACGGGATTTGATGTCATCGT	55.3
VAMP2	CAAATACTGGTGGAAAAACCTCAA	53.8	TTAAGTGCTGAAGTAAACGATGATGA	54.6
GAPDH	CAGCCTCGTCTCATAGACAAGATG	56.8	CAATGTCCACTTTGTACAAGAGAA	55.6
PGK	GCCCATGCCCGACAAGT	58.7	CATCCTTGCCCGAGCAGAGA	57.3

### Measurement of exocytosis in primary culture of bovine chromaffin cells

Chromaffin cells were isolated from fresh bovine adrenal glands by perfusion with collagenase, purified on self-generating Percoll gradients and maintained in culture as previously described (Thahouly et al., 2021). Chromaffin cells were transfected with 1 µg pmR-ZsGreen-*bta*-miR-34a-5p plasmid by electroporation (Amaxa Nucleofactor systems, Lonza, Levallois, France).

The bovine MIR34a gene (GeneID: 100170930) was amplified by PCR from gDNA of bovine chromaffin cells in primary culture, including flanking sequences of 255 and 203 bp (34a\_F22\_HindII: GCCAAGCTTGGGATGCAAGGTGGAGTCTC, 34a-R586\_BamHI: GGCGGATCCCAAATTCCTCCCAGCCAGGA). The fragment was then inserted into the pmR-ZsGreen plasmid (Takara Bio, Saint-Germain-en-Laye, France), which enables expression of the fluorescent protein and miRNA from a single transcript that is matured to generate the mature miRNA. The integrity of the cloned sequence was verified by sequencing.

Catecholamine secretion was measured by carbon fiber amperometry. Briefly, a carbon fiber electrode of 5  $\mu\text{m}$  diameter (ALA Scientific Instruments) was held at a potential of +650 mV compared with the reference electrode (Ag/AgCl) and approached close to one cell. Secretion of catecholamines was induced by a 10 s pressure ejection of a 100 mM  $\text{K}^+$  solution from a micropipette (Femtotips<sup>®</sup>, Eppendorf) positioned 10  $\mu\text{m}$  from the cell and recorded over 60 s. The amperometric recordings were performed with an AMU130 amplifier (Radiometer Analytical), calibrated at 5 kHz, and digitally low-pass filtered at 1 kHz. Analysis of the amperometric recordings was performed as previously described with a macro (laboratory of Dr. R. Borges; <https://rborges.webs.ull.es/protocols-and-software/>) written for Igor software (WaveMetrics), allowing automatic spike detection and extraction of spike parameters (Segura et al., 2000). The spike parameters analysis was restricted to spikes with amplitudes higher than 5 pA, which were considered as exocytic events. All spikes identified by the program were visually inspected. Overlapping spikes and spikes with aberrant shapes were discarded for parameters analysis. Quantal size (spike charge, Q) of each individual spike was measured by calculating the spike area above the baseline. Spike area is defined as the time integral of each transient current,  $I_{\text{max}}$  as the height of each spike, half-width as the width of each spike at half its height ( $T_{1/2}$ ) and  $T_{\text{peak}}$  as the spike rise time (Figure 7B).

The number of exocytic sites was evaluated by quantifying the dopamine- $\beta$ -hydroxylase exposed to the extracellular medium during exocytosis. Chromaffin cells were maintained in resting conditions (Locke solution) or stimulated for 3 min with a 59 mM  $\text{K}^+$  solution (85.7 mM NaCl, 59 mM KCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 11 mM glucose, 0.56 mM ascorbic acid, 0.01 mM EDTA and 15 mM HEPES, pH adjusted to 7.2) containing 0.5% of an anti-D $\beta$ H antibody (MAB308 Millipore<sup>®</sup>). Cells were washed once with Locke solution and immediately fixed with cold 4% PBS-paraformaldehyde solution (15710 EMS<sup>®</sup>) for 10 min. Cells were then washed five times with a PBS solution and non-specific sites were saturated by incubating cells for 2 h at 37°C with a 3% PBS-BSA (A7030 Sigma<sup>®</sup>) solution containing 10% goat serum (G9023 Sigma<sup>®</sup>). After 5 other washes with PBS, cells were then incubated 1h at 37°C with a PBS-BSA 3% solution containing 0.1% secondary goat anti-mouse alexa555 antibodies. Quantification of peripheral D $\beta$ H staining was performed on the ICY software.

## **Statistics**

Statistical analyses are performed with Prism software (v. 9.0, GraphPad Software, Boston, USA) and differences are considered significant for p-values < 0.05. A Kruskal-Wallis test with Benjamini, Krieger and Yekutieli correction is used for secretion experiments with the luminescent reporter, and expression levels obtained in RT-qPCR are analyzed using a t-test. For amperometric assays, statistics are calculated using a Mann Whitney rank sum test, while for D $\beta$ H labeling, a one-way ANOVA test is used, followed by a Tukey multiple comparison post-test.

## **RESULTS**

### **Identification of the main genes involved in the exocytosis process**

Genes strongly involved in the exocytosis process were selected from 50 gene lists obtained from Gene Ontology, KEGG, Reactome, and Uniprot keyword databases. Of the 2,510 genes identified for a total of 11,923 citations (i.e. an average of 4.8 citations per gene, data not shown), the 28 genes cited at least 20 times were retained, followed by an in-depth bibliographical analysis of the other putative genes in order to estimate their involvement in exocytosis. In the end, we retained 95 genes likely to exert a major influence on the exocytosis process (with a total of 1,529 citations, i.e., an average of 16 citations per gene, Supplementary Table 1) and called them ExoDB genes. SNARE proteins, synaptotagmins, and calcium sensors were among the most frequently cited (>30). A protein-protein interaction (PPI) network analysis using the STRING-DB tool (v11.0) confirms the relevance of the proteins encoded by the ExoDB genes, as they are interconnected (an average of 13 interactions per gene, Figure 2). The enrichment p-value for PPI (< 10<sup>-16</sup>) indicates that these proteins are significantly associated with the same biological process. Furthermore, the selection of 95 genes significantly enriched 49 of the 50 gene sets used, confirming our results (Supplementary Table 2).

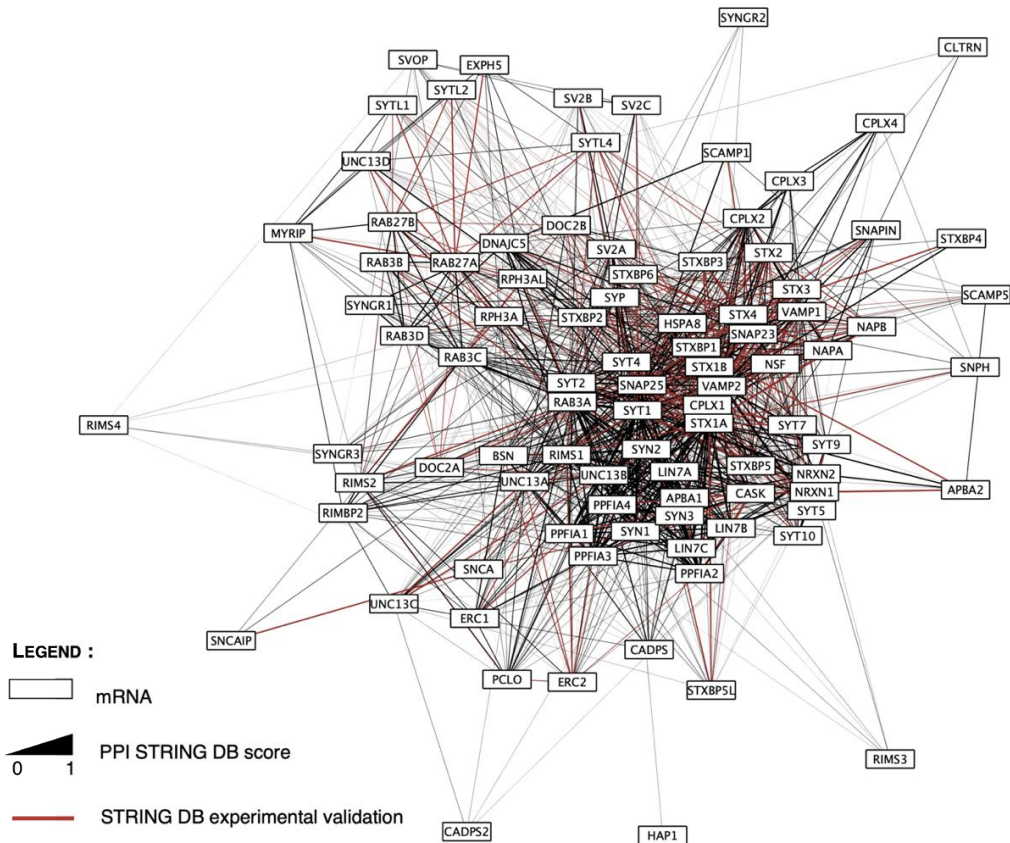


Figure 2 Protein-protein interaction (PPI) network among the 95 selected ExoDB genes

The thickness of the edge represents the enrichment p-value for PPIs obtained using the STRING-DB tool. Experimentally validated interactions are in red.

### Bioinformatics identification of miRNAs potentially regulating ExoDB genes

The bioinformatics approach we developed, combining predictions from mirDIP and negative correlations from oncomiR, enabled us to identify a set of broadly phylogenetically conserved miRNAs (as defined in miRbase) that may regulate mRNAs encoded by ExoDB genes. This analysis revealed a total of 1,002 interactions common to mirDIP and oncomiR involving 86 genes and 148 miRNAs, so 9 genes do not appear to be regulated by miRNAs (Figure 3). Among these interactions, 149 were experimentally validated using the TarBase tool, with an average of 6.8 interactions per miRNA. However, half the miRNAs (73) had five or fewer interactions. Among the miRNAs with the most interactions were miR-16-5p, miR-15-5p, miR-15a-5p (belonging to the same miRNA family), and miR-34a-5p, with 25, 23, 23, and 20 interactions, respectively. This large network is therefore the first to illustrate the regulation of exocytosis genes by miRNAs.

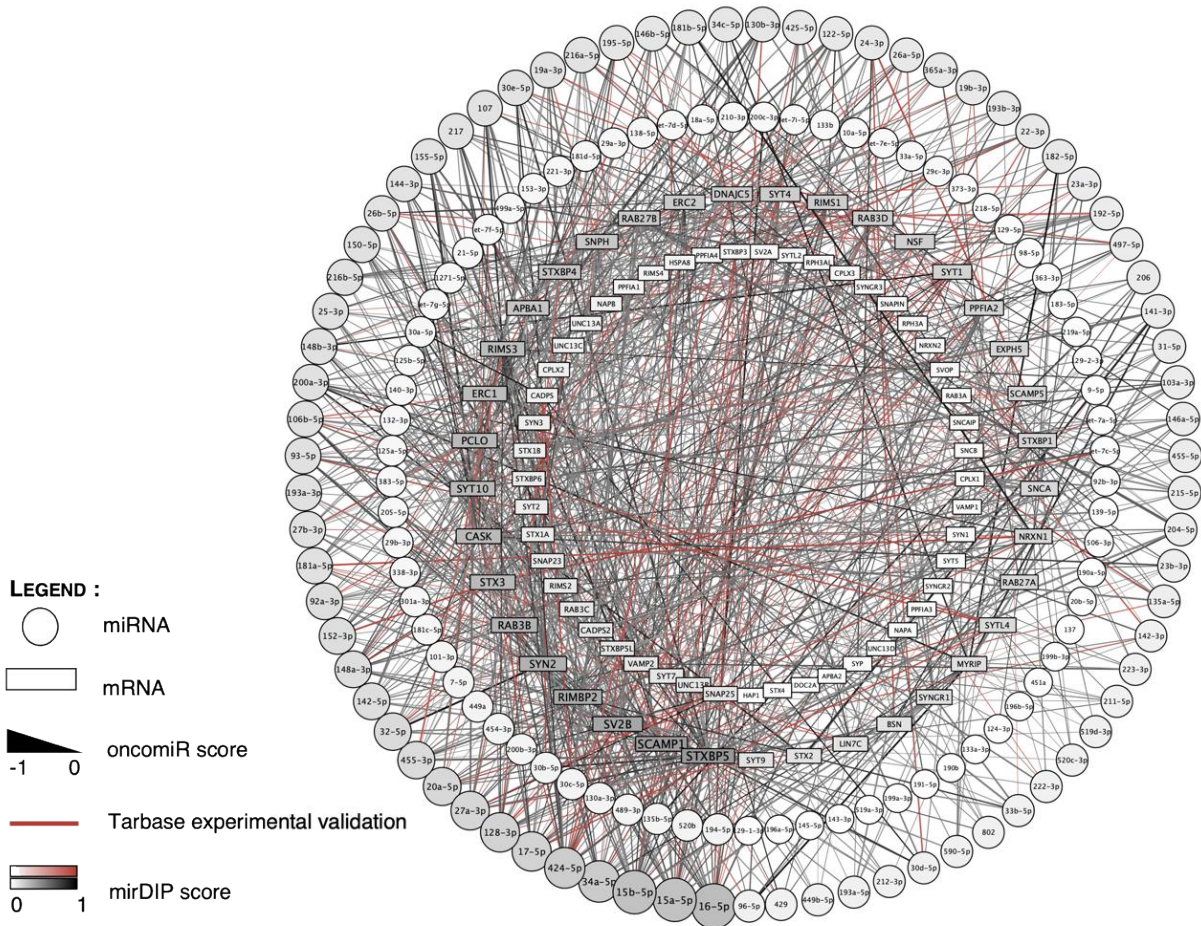


Figure 3 ExoDB interaction network between exocytosis genes and their potential regulatory miRNAs

The two central circles contain the 86 exocytosis-related genes targeted by 148 miRNAs, represented in the two outer circles. An interaction, indicated by an edge, corresponds to a prediction by both oncomiR (line thickness) and mirDIP (line color intensity). The size of the circles (miRNAs) and rectangles (mRNAs) is proportional to the number of interactions. Experimentally validated interactions identified by Tarbase are shown in red.

ExoDB then served as the basis for deciphering the PCC-specific situation. To do this, we used two transcriptomic datasets to identify genes (GSE19422) and miRNAs (GSE29742) differentially expressed in PCC compared to normal adrenal medulla, and then filtered this information from the ExoDB network. This PCC-specific subnetwork comprises 41 dysregulated mRNAs and 31 miRNAs, as well as 154 interactions, 29 of which are experimentally validated (Figure 4). To better understand the potential regulation exerted by these miRNAs, we let the subnetwork self-organize according to the oncomiR co-expression score using Cytoscape's "edge-weighted spring-embedded layout" parameter. Its analysis with the NetworkAnalyzer tool enabled us to classify miRNAs according to their level of potential regulation on exocytosis (Supplementary Table 3). By assessing network parameters, including number of interactions per node, radiality, stress, average shortest path length, and closeness

centrality, we identified a set of miRNAs significantly influencing this subnetwork (Supplementary Table 3). Among them, miR-424-5p, miR-34a-5p, and miR-32-5p target more than 10 exocytosis genes. Interestingly, miRNAs that exert a major influence on the network were found to be underexpressed in PCC compared with normal medulla (miR-193b-3p, for example, whose expression is 16-fold lower). In this PCC-specific subnetwork, underexpressed miRNAs (20 out of 31 miRNAs) tend to occupy central positions, while overexpressed miRNAs are often located in peripheral region. This result is also corroborated in the case of genes, with the central positions of the network mainly occupied by genes overexpressed in PCC (35 out of 41), which are mainly targeted by underexpressed miRNAs.

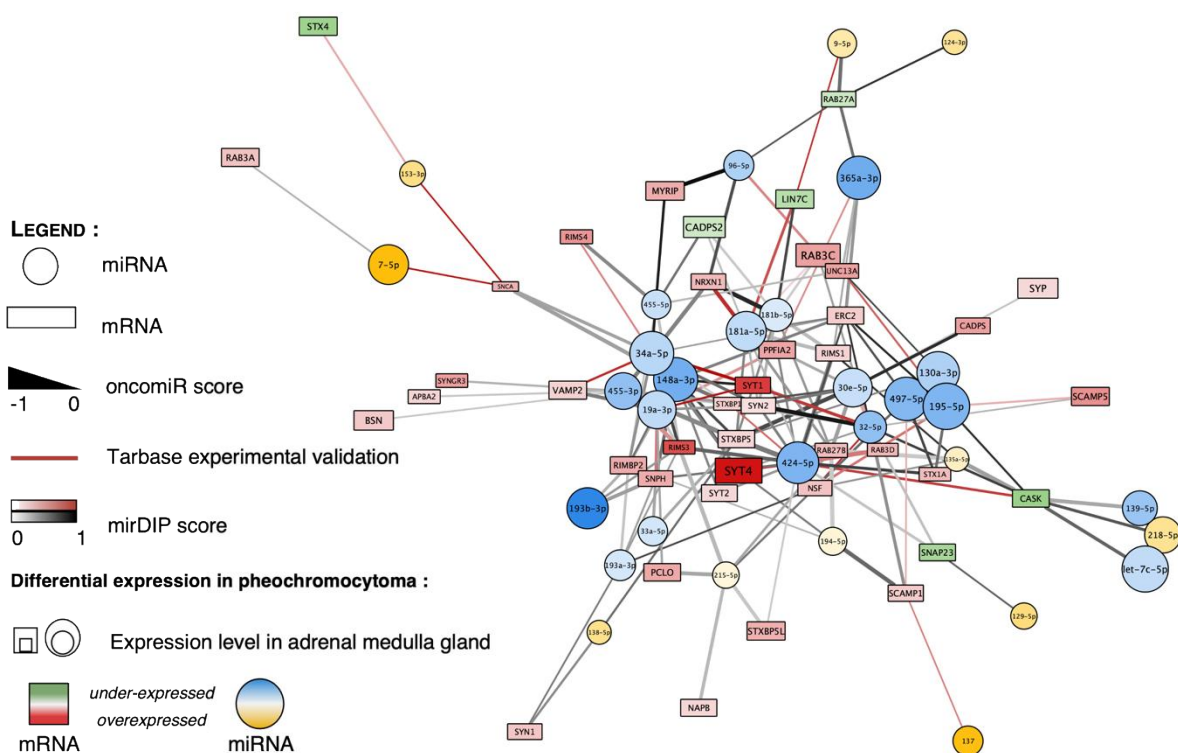


Figure 4 MiRNA-mediated regulation of exocytosis in PCC

Data from the ExoDB interaction network were selected to include only genes and miRNAs differentially expressed in PCC (from transcriptome data GSE19422 and GSE29742). In total, 154 interactions common to oncomiR (stop thickness) and mirDIP (stop intensity) were identified between 31 miRNAs (round) and 41 genes (rectangle,  $FC > 1.5$ ,  $p\text{-value} \leq 0.05$ ). Experimentally validated interactions are shown in red. The corresponding network is visualized using Cytoscape. The size of the nodes is proportional to miRNA and gene expression in normal adrenal medulla, while their color represents the direction of deregulation in PCC.

### A set of 20 miRNAs regulate secretion activity in PC12-2luc cells

The 31 miRNAs of interest were screened for their ability to modulate secretory activity. For this we used a PC12 cell line derived from a rat PCC and expressing the luminescent reporter



*hGH1-Nluc* specifically localized in dense-core secretory vesicles as well as a firefly luciferase as a stable expression control (PC12-2luc). The secretion activity of resting PC12-2luc cells is assessed by quantifying the amount of Nluc per cell, normalized by Fluc. Indeed, a slowdown of the basal secretion leads to an accumulation of the reporter within the cell. Under resting conditions and 72h after transfection of rat miRNAs (10 nM), a significant accumulation of the luminescent reporter was observed in these cells compared with the negative control for 10 miRNAs (+48.7% to +263.7%, Figure 5A) indicating a slowdown in basal secretion. Notably, *rno-miR-138-5p* stood out from the other miRNAs with a particularly high effect (+264%). When these PC12-2luc cells are stimulated (BaCl<sub>2</sub>, 2 mM, 30 min), 14 miRNAs induce a significant repression of luminescent reporter secretion (-30.3% to -71.2%, Figure 5B). Moreover, for 7 of them (*rno-miR-124-3p*, *rno-miR-135a-5p*, *rno-miR-365a-3p*, *rno-miR-96-5p*, *rno-miR-130a-3p*, *rno-miR-34a-5p*, *rno-miR-455-5p*), this effect is more marked (>42.8%) than that induced by positive controls consisting of siRNAs directed against *Stx1a* and *Snap25* mRNAs, which encode proteins essential for calcium-regulated exocytosis. We then compared the effect exerted by each of these rat miRNAs according to the experimental conditions (resting or stimulated), enabling us to identify 3 groups (Figure 5C). The R group (resting, blue) contains 6 miRNAs, the S group (stimulated, yellow) 10 miRNAs, and the RS group (resting and stimulated, green) 4 miRNAs. This distribution suggests that these 20 miRNAs may control distinct steps in exocytosis.

To reinforce our observations, we assessed the effect of increasing concentrations of *rno-miR-34a-5p*, one of the RS group miRNAs, on the secretion kinetics of PC12-2luc cells by evaluating the area under the curve (Figure 5D, E, F). From the lowest concentration (0.3 nM), *rno-miR-34a-5p* induced a reduction in the amount of reporter secreted within 30 min (-23%, Figure 5E) and accumulation of luminescent reporter in resting cells (+13.3%, Figure 5F). The use of higher doses (3 and 30 nM) shows that the maximum effect is achieved in both barium-stimulated (+56.8%) and resting (-52.8%) conditions. On the other hand, the effect of *rno-miR-34a-5p* on secretory activity is observed from the shortest times (3 and 8 min). These functional results confirm those obtained during the screening of the 31 miRNAs.

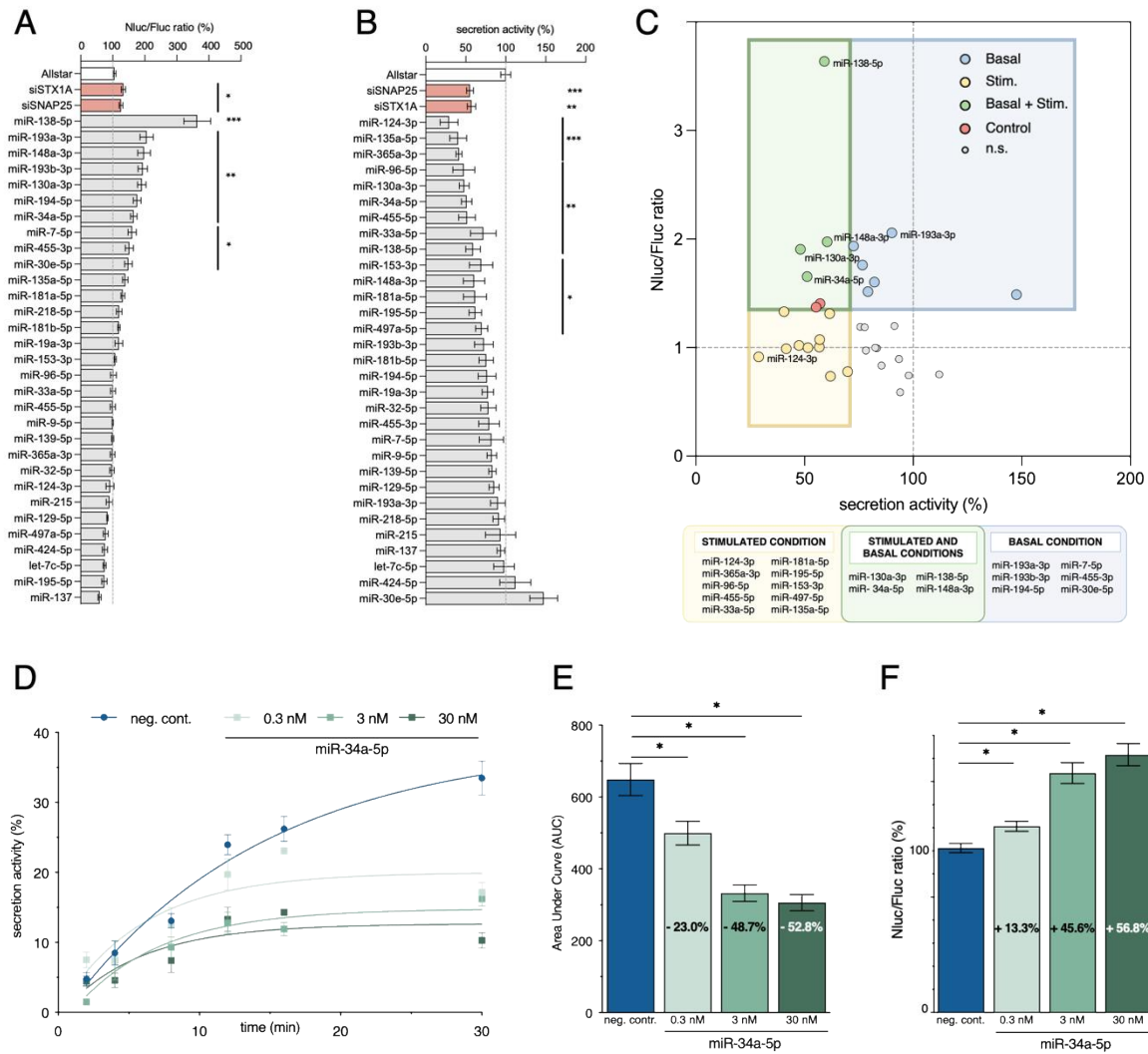


Figure 5 Assessment of the effect of ExoDB's 31 miRNAs on the secretory activity of PC12-2luc cells

PC12-2luc cells were transfected with 10 nM miRNA mimics and incubated with stimulation buffer containing barium (2 mM) for 30 min. A) Basal secretory activity is calculated by a normalized ratio expressed as a percentage between the amount of *hGH1*-Nluc reporter in the cells and the total amount of Fluc, used as a stable expression control, both measured by luminescence. B) Stimulated secretory activity is measured as the percentage of *hGH1*-Nluc reporter secreted by cells in the supernatant, relative to total *hGH1*-Nluc activity quantified by luminescence. Allstar siRNA, which has no known homology with a mammalian gene, is used as a negative control. siRNAs targeting mRNAs encoding SNARE proteins *Stx1a* and *Snap25* are used as positive controls. Statistical analysis against the negative control was performed using a Kruskal-Wallis test (N=6; p-values: \*\*\*  $\leq 0.001$ , \*\*  $\leq 0.01$ , \*  $\leq 0.05$ ). C) miRNAs were represented according to the intensity of their effect on resting and stimulated secretion and are colored according to their group (yellow: effect on barium-stimulated secretion; blue: effect on basal secretion; green: effect in both conditions; gray: no significant effect). D) Representative example of barium-stimulated secretion kinetics performed over 30 min for increasing concentrations of *rno*-miR-34a-5p (0.3 nM, 3 nM and 30 nM). An siRNA (10 nM) targeting *Stx1a* mRNA was used as a positive control. E) The corresponding areas under the curves were quantified and the values are shown on the respective histograms. F) The effect of

*rno*-miR-34a-5p on resting secretion was also assessed. Experimental conditions were compared with each other using a Kruskal-Wallis test (N=4; p-value: \*  $\leq 0.05$ ).

### **Experimental validation of interactions between miRNAs and their target mRNAs.**

We used RT-qPCR to confirm ExoDB interactions between miRNAs and their target mRNAs that were predicted by bioinformatics approaches from expression data in PCC. It should be noted that the *CASK*, *CADPS2*, *ERC2*, *RAB27B* and *RIMS1* genes were not studied as we were unable to amplify them from PC12 cells, suggesting a low level of expression. We confirmed this hypothesis by analyzing transcriptome data of sample GSM114191, a PC12 cell control from the GSE5073 series (data not shown) (Lattanzi et al., 2007). Similarly, the *PCLO*, *NAPB*, *STXBP5L* and *SNAP23* genes were excluded as bioinformatically none of the functional miRNAs targeted them. Thus, of the 80 interactions evaluated in our cell model, 13 were significantly validated (red dots, N=3,  $p < 0.05$ , Figure 6A). Specifically, these 13 interactions involve 11 genes and 9 miRNAs (Figure 6B). In general, the genes identified are targeted by only 1 or 2 miRNAs, which in turn regulate 1 or 2 genes. For example, *rno*-miR-34a-5p represses in similar proportions the expression of *VAMP2* (-59%) and *SYT1* (-63%), which encode two key proteins in exocytosis (Supplementary Figure 1). Of these 13 interactions, 6 are experimentally validated by the TarBase tool, including the two interactions identified for miR-34a-5p (red edges, Figure 6B). Surprisingly, transfection of 3 of these rat miRNAs (*rno*-miR-194-5p, *rno*-miR-195-5p and *rno*-miR-153-3p) induces a significant increase - not repression - of their target mRNAs (*RIMBP2*, *SCAMP5* and *STX4*, respectively), suggesting the existence of an indirect regulation for these genes. Interestingly, RT-qPCR results correlated with mirDIP prediction scores ( $r = -0.661$ ,  $R^2 = 0.437$ ,  $Y = -0.2263X + 0.3835$ , Figure 6C), confirming the quality of the initial bioinformatics predictions.

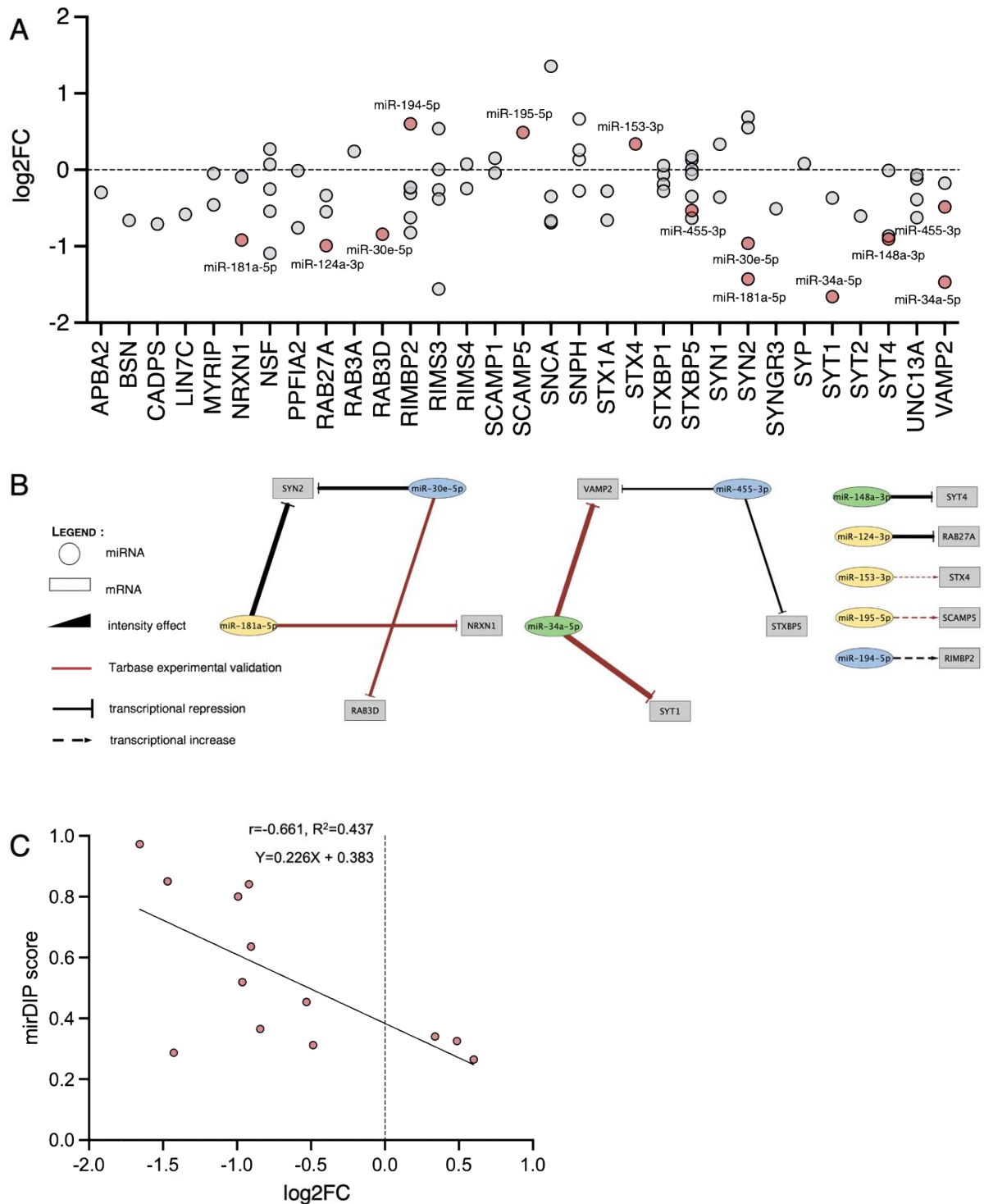


Figure 6 Evaluation of miRNA-mRNA interactions by RT-qPCR

A) Eighty miRNA-mRNA interactions derived from ExoDB and predicted in PCC were assessed by RT-qPCR after transfection of miRNA mimics (10 nM). Results are expressed as the log<sub>2</sub> of the Fold Change (log<sub>2</sub>FC) of the target genes for each predicted miRNA compared with the negative control (AllStar), with significant interactions (N=3, p-value ≤ 0.05, t-test) shown in red. Detailed results are provided in the Supplementary Figure 1. B) miRNA:mRNA interactions validated by RT-qPCR are visualized as a network using Cytoscape. miRNAs are colored according to their effect on secretion (R group in blue, S group in yellow, RS group in green).

Transcriptional repressions and increases are indicated by solid arrows and dashed repressive arrows, respectively. The width of the edge (interaction) corresponds to the intensity of the effect; those experimentally validated by the TarBase tool are shown in red. C) A negative Pearson correlation is observed between mirDIP score and RT-qPCR values of validated interactions ( $r=-0.661$ ,  $R^2=0.437$ ,  $Y=0.226X + 0.383$ ).

### **Effect of *bta*-miR-34a-5p on calcium-regulated exocytosis in the adrenal chromaffin cells**

To specifically test the involvement of *bta*-miR-34a-5p on calcium-regulated exocytosis, we used primary culture of bovine chromaffin cells. We recorded catecholamine secretion by carbon fiber amperometry and we quantified the number of exocytic spots by immunostaining (Figure 7). Representative amperometric traces recorded from a cell expressing *bta*-miR-34a-5p and a control cell were illustrated in Figure 7A. Each individual spike represents a single granule fusion event and is composed of a rapid rise of the electrode current corresponding to the oxidation of catecholamines quickly released at high concentration through the fusion pore as it dilates. As shown in Figure 7B, expression of *bta*-miR-34a-5p decreased by nearly 34% the frequency of fusion. The spike rise is then followed by a slower decay representing a decreased of the catecholamine flux through the pore as the granule empties. In addition to the quantification of number of events per cell, the analysis of individual amperometric spikes provides valuable dynamic information on the exocytic process. Hence, the surface area or charge (Q) is proportional to the amount of catecholamines released per event, the spike amplitude value ( $I_{max}$ ) reflects the maximal flux of catecholamines, whereas the half-width ( $T_{1/2}$ ), and the time to peak ( $T_{peak}$ ) reflect the duration of the exocytotic event and the kinetics of the fusion pore expansion, respectively (Figure 7C). Chromaffin cells expressing *bta*-miR-34a-5p displayed broader spikes with an increased half width and time to peak, and a reduced  $I_{max}$  (Figure 7E, G-H). However, the spike charge is not affected by *bta*-miR-34a-5p (Figure 7F). Altogether, these amperometric analysis demonstrate that expression of *bta*-miR-34a-5p inhibits the number of exocytic events and slow down the kinetics and the duration of the pore dilation without affecting the total amount of catecholamine released per single granule.

To validate the inhibitory effect of *bta*-miR-34a-5p on exocytic events, we measured exocytosis by quantifying the amount of dopamine- $\beta$ -hydroxylase (D $\beta$ H, a secretory granule marker) visiting the cell surface after granule fusion (Figure 7I-K). Intriguingly, the expression of *bta*-miR-34a-5p led to a significant 31% decrease in the amount of D $\beta$ H at the cell surface in stimulated chromaffin cells (Figure 7J, K), confirming that exocytosis is efficiently inhibited, as measured by amperometry.

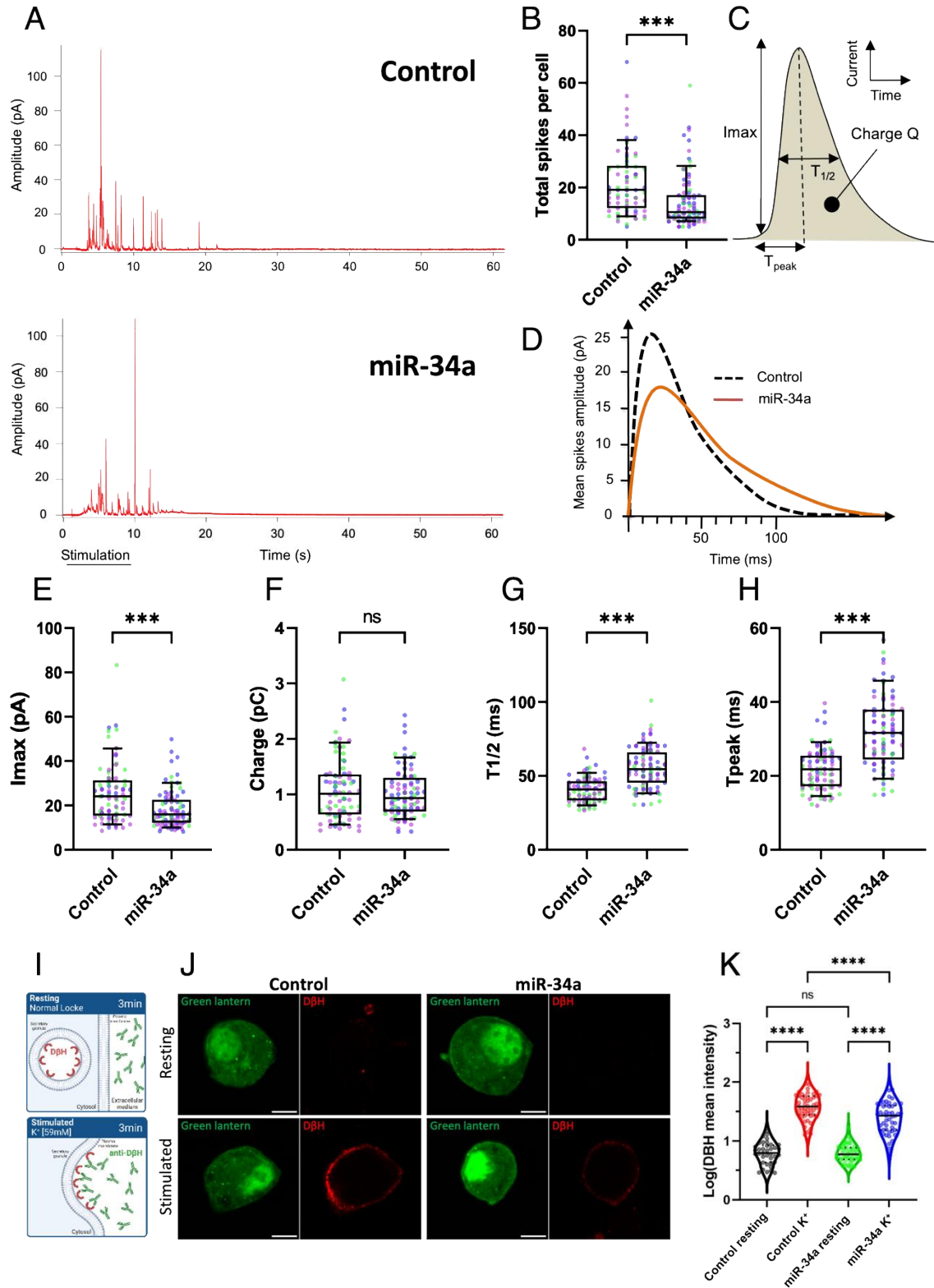


Figure 7 *bta-miR-34a-5p* overexpression affects exocytosis of primary adrenal bovine chromaffin cells (A-H) Chromaffin cells in culture were transfected with a plasmid coding for *bta-miR-34a-5p* and mGreenLantern or for mGreenLantern (control). Cells were stimulated with a local application of 100mM  $K^+$  for 10 s and catecholamine secretion was monitored using carbon fiber amperometry. Each plot represents the 1st quartile

(bottom line), the median (line in the box), and the third quartile (upper line). Whiskers correspond to the 10th (bottom) and the 90th (top) percentile; dots represent a measure from a single cell and are colored according to independent experimental repeats. All the average amperometric data are detailed in Tableau 3 (A) Typical amperometric recording obtained from a cell transfected with *bta*-miR-34a-5p and from a control cell. (B) Box and whisker diagrams illustrating the number of exocytic events per cell; \*\*\*:  $p < 0.001$  compared to control, Mann Whitney Rank Sum test. (C) Scheme illustrating the different parameters of the amperometric spike. (D) Superimposition of averaged spikes obtained from *bta*-miR-34a-5p expressing cells and control cells. (E, F, G and H) Box and whisker diagrams illustrating the amplitude ( $I_{max}$ ), the charge, the half-width ( $T_{1/2}$ ) and the rise time ( $T_{peak}$ ) of single spikes, respectively. \*\*\*:  $p < 0.001$  compared to control, ns: nonsignificant, Mann Whitney Rank Sum test. (I-K) Chromaffin cells were transfected with a plasmid coding for *bta*-miR-34a-5p and mGreenLantern or for mGreenLantern (control). Cells were stimulated with 59mM  $K^+$  for 3 min in the presence of anti-D $\beta$ H antibodies and exocytic spots were directly revealed (J). Representative images of exocytic spots (D $\beta$ H) staining of control- and *bta*-miR-34a-5p-expressing chromaffin cells in resting (Normal Locke's solution) and stimulated (59mM  $K^+$ ) condition. Channels are shown individually (Green: Green lantern and Red: D $\beta$ H); Scale bar: 5 $\mu$ m. (K) Violin plot representing peripheral D $\beta$ H staining of transfected cells after 3min resting or stimulation; dots represent a measure from each single cell; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ , ns: non-significant, ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.

*Tableau 3 Characteristics of amperometric spikes from bovine chromaffin cells transfected with bta-miR-34a-5p*

Amperometric recordings were performed on primary cultured bovine chromaffin cells. Cells were stimulated with 100 mM of  $K^+$  for 10 s. The number of cells, the number of amperometric spikes per cell and the different amperometric spike parameters are indicated. Results represent the mean  $\pm$  SEM. Bold values are considered significantly different from the control condition; \*\*\* $p < 0.001$  compared to control; Mann Whitney Rank Sum test.

Condition	Control	<i>bta</i> -miR-34a-5p
Number of cells	78	88
Total number of spikes	1705	1276
Number of analyzed spikes	1454	1081
Total number of spikes/cell	21.86 $\pm$ 1.39	<b>14.50 <math>\pm</math> 1.07 ***</b>
Number of analyzed spikes/cell	18.64 $\pm$ 1.18	<b>12.28 <math>\pm</math> 0.91 ***</b>
$I_{max}$ (pA)	25.82 $\pm$ 1.54	<b>18.36 <math>\pm</math> 0.91 ***</b>
Charge Q (pC)	1.09 $\pm$ 0.06	1.02 $\pm$ 0.05
$T_{1/2}$ (ms)	40.78 $\pm$ 0.97	<b>55.38 <math>\pm</math> 1.46 ***</b>
$T_{peak}$ (ms)	21.85 $\pm$ 0.65	<b>31.97 <math>\pm</math> 1.03 ***</b>

## DISCUSSION

The aim of this study is to elucidate the etiology of catecholamine hypersecretion, a feature of pheochromocytoma (PCC), a rare neuroendocrine tumor. In particular, we are seeking to better understand the involvement of miRNAs in this process. Indeed, we have recently shown that the excessive secretion of catecholamines in human PCC is not solely the result of tumor burden, but also derives from the disruption of the exocytosis mechanism and in particular from the general increase in the expression of exocytosis-related genes, both at transcriptomic and protein level (Houy et al., 2022). Here, we highlight the significant role played by a group of 20 miRNAs in the post-transcriptional regulation of exocytosis-related gene expression. The global underexpression of these miRNAs in the PCC is linked to the overexpression of exocytosis genes and thus appears to participate in the overactivation of catecholamine secretion.

Our approach has been to develop the ExoDB database to provide, for the first time to our knowledge, an overview of miRNA-mediated calcium-regulated exocytosis. One of the strengths of our bioinformatics approach is that it combines the prediction of regulatory miRNAs with an analysis of the co-expression of the miRNA:mRNA pair. This reduces the false positive rate inherent in predictive approaches alone and therefore improves the relevance of the network (Quillet et al., 2021). This general network is applicable to all cell types whose regulated secretion pathway is functional, facilitating the global identification of regulatory miRNAs, particularly in associated pathologies. ExoDB incorporates exocytosis-related genes previously identified as miRNAs targets. For instance, Vamp2, Snap25 and Stx1 are targeted by miR-153, Stx1 is targeted by miR-29a, and Stxbp1 is targeted by miR-335 in insulinomas (Bagge et al., 2013; Salunkhe et al., 2017; Sun et al., 2020), while Vamp2 is targeted by miR-34c, and Snap25 and Syt1 are targeted by miR-128 in neuronal pathologies such as Alzheimer's disease (Hu et al., 2015; Shvarts-Serebro et al., 2021). Additionally, Rab3b is targeted by miR-200b in gliomas (Liu et al., 2014). The current version of ExoDB is a first step towards the integration of other levels of epigenetic or post-transcriptional regulation (DNA methylation, transcription factors, lncRNA, ceRNA etc.) available in massive sequencing projects such as TCGA and GTEx. This enrichment should therefore make it possible to improve the identification of regulatory motifs specifically linked to exocytosis.

The miRNA and gene expression data used in our study included 6 normal adrenal medullary samples each, as well as 36 and 61 PCC samples, respectively (De Cubas et al., 2013; López-Jiménez et al., 2010). These data are the only ones available to our knowledge that include



normal adrenal medullary samples. Although they are often associated with PCCs, we chose not to include PGL samples in order to avoid potential biases associated with their tissue localization and thus enhance the homogeneity of our study. We also chose not to distinguish the genetic clusters associated with the samples in order to retain sufficient statistical power for the analyses. We are therefore likely to highlight miRNAs and genes typically deregulated in PCC, independently of associated genetic alterations.

We then took advantage of ExoDB information to identify genes and miRNAs regulating exocytosis specifically in PCC. Interestingly, we found central players in exocytosis such as Vamp2 and Stx1a, which are directly involved in GSCD fusion with the plasma membrane, direct regulators of this fusion such as Stxbp1 and Unc13A, calcium sensors such as Syt1, and GTPases Rab3(A, C, D) and Rab27 (Dulubova, 1999; Dulubova et al., 2005; Rizo, 2022; Sudhof & Rizo, 2011). This indicates that miRNAs may regulate exocytosis in the PCC by broadly controlling the expression of a large number of genes. On the other hand, it appears that 65% of the 41 target mRNAs (27/41) we identified had already been revealed in our previous study to be over-expressed, both transcriptomically and proteomically (Houy et al., 2022). Differentially expressed miRNAs are globally underexpressed in the PCC, and this is the case for 20 of the 31 identified in the ExoDB subnetwork. Moreover, several of them are already known and documented by Tarbase to inhibit the expression of exocytosis-related genes. Thus, *hsa-miR-19a-3p*, *hsa-miR-32-5p* and *hsa-miR-34a-5p* interact with Syt1, *hsa-miR-195-5p* regulates Unc13A and *hsa-miR-424-5p* controls the expression of Stxbp1, Syt4, Rab3D. All this information on miRNAs and their potential targets, gathered in ExoDB's PCC subnetwork, confirms the relevance of our approach.

Subsequently, we were able to experimentally confirm that 65% (20/31) of these miRNAs regulate secretory activity in PC12 cells, underlining the quality of our initial approach. The high sensitivity and reproducibility of the luminescent cell-based assay we developed enabled us to significantly measure subtle variations in secretion, as low as 30%, after transfection of the miRNAs of interest into PC12-2luc cells. This luminescent system could be easily adapted to other cell models of pathologies linked to secretion defects, such as the INS1 cell line derived from a rat insulinoma (Asfari et al., 1992). Our analyses revealed the existence of 3 groups (R, S, RS) of miRNAs according to their effect on secretion. This suggests that the differences observed between the R and S groups may correspond to the regulation of target mRNAs involved only during stimulation, whereas the RS group may exert a broader effect due to the

number and nature of the target genes involved. Further studies will be needed to decipher the reasons for these differences.

The aim of the screening was to identify miRNAs potentially regulating exocytosis. For this, we used a mimics dose of 10 nM for which the maximum effect already seems to have been reached, at least as far as *rno*-miR-34a-5p is concerned, as shown by dose-response assays. It would therefore be interesting to be able to work with lower doses, in particular to evaluate the combination of certain miRNAs following their co-transfection. Indeed, miRNAs generally exert limited effects on their target mRNAs (Baek et al., 2008; Selbach et al., 2008), and it is the addition of their individual regulations that most often generates physiological effects. For example, co-transfection of *rno*-miR-34a-5p and *rno*-miR-455-3p could more strongly inhibit exocytosis in PC12-2luc cells by doubling repression of Vamp2 expression, thus providing a molecular lock.

Experimentally, we were able to confirm 13 interactions by RT-qPCR from miRNAs belonging to the 3 groups. Although limited in number, these interactions appear to be central to the regulation of exocytosis, as they involve Vamp2 (*rno*-miR-34a-5p, *rno*-miR-455-3p), Syt1 (*rno*-miR-34a-5p), Stxbp5 (*rno*-miR-455-3p) and Rab27A (*rno*-miR-124-3p). Other interactions, probably weaker, could not be validated due to the limited number of experimental replicates. On another level, these results also demonstrate the good performance of bioinformatics predictions from miRDIP, as indicated by the correlation between the two.

Among the miRNAs we have identified, *hsa*-miR-34a-5p could be one of the major regulators of exocytosis, as suggested by i) the analysis of the ExoDB subnetwork in the PCC, ii) its effect on the secretion activity of PC12-2luc cells both at resting and following stimulation, and iii) the nature of the target mRNAs it regulates. This prompted us to study more precisely the effect of its orthologous miRNA, *bta*-miR-34a-5p, on the mechanisms of exocytosis, and the results obtained by carbon-fiber amperometry and D $\beta$ H immunostaining overlap. To our knowledge, this is the first time that carbon fiber amperometry has been used to characterize the functional impact of a miRNA on calcium-regulated exocytosis. The inhibition of exocytosis events following overexpression of *bta*-miR-34a-5p in primary cultures of bovine chromaffin cells was found to corroborate the effect observed in rat PC12-2luc cells. This suggests that the regulation of exocytosis by miR-34a-5p is a phylogenetically conserved process. On the other hand, we have shown that *bta*-miR-34a-5p slows down the kinetics of exocytosis events. The effects induced by miR-34a-5p on exocytosis may therefore be explained by post-transcriptional repression of its targets Vamp2 and Syt1.

In our previous analysis, we also identified overactivation of the catecholamine biosynthesis pathway. Interestingly, we observed no change in catecholamine (Q) loading in exocytosis spikes following over-expression of *bta*-miR-34a-5p, suggesting that the effects of this miRNA are restricted to the exocytosis process and that it does not regulate catecholamine production. Underexpression of *hsa*-miR-34a-5p in human PCCs could therefore contribute, along with other miRNAs, to catecholamine hypersecretion via an increase in the number of exocytosis events and acceleration of their kinetics, which we highlighted in a previous study (Houy et al., 2022). It would be interesting to confirm these results by transfecting *hsa*-miR-34a-5p into primary cultures of human PCCs.

## **CONCLUSION**

In conclusion, we show for the first time that a set of 20 miRNAs regulate exocytosis in PCC compared with healthy tissue, and that they participate in the hypersecretion of catecholamines that characterizes this tumor. More generally, the results of this study represent a significant advance in the understanding of defects in hormone and neurotransmitter secretion associated with pathologies such as NETs and SNAREopathies (Dineen et al., 2016; Onaitis et al., 2000; Verhage & Sørensen, 2020). This reinforces our appreciation of the major impact miRNAs play in the regulation of cellular processes and their involvement in the maintenance of homeostasis.

## REFERENCES

- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A., & Wollheim, C. B. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*, *130*(1), 167–178. <https://doi.org/10.1210/endo.130.1.1370150>
- Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P., & Bartel, D. P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, *455*(7209), 64–71. <https://doi.org/10.1038/nature07242>
- Bagge, A., Dahmcke, C., & Dalgaard, L. (2013). Syntaxin-1a is a Direct Target of miR-29a in Insulin-producing  $\beta$ -Cells. *Hormone and Metabolic Research*, *45*(06), 463–466. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1333238>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs. *Cell*, *116*(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, *55*(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cannon, W. B., & de la Paz, D. (1911). EMOTIONAL STIMULATION OF ADRENAL SECRETION. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *28*(1), 64–70. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1911.28.1.64>
- De Cubas, A. A., Leandro-García, L. J., Schiavi, F., Mancikova, V., Comino-Méndez, I., Inglada-Pérez, L., Perez-Martinez, M., Ibarz, N., Ximénez-Embún, P., López-Jiménez, E., Maliszewska, A., Letón, R., Gómez Graña, Á., Bernal, C., Álvarez-Escolá, C., Rodríguez-Antona, C., Opocher, G., Muñoz, J., Megias, D., ... Robledo, M. (2013). Integrative analysis of miRNA and mRNA expression profiles in pheochromocytoma and paraganglioma identifies genotype-specific markers and potentially regulated pathways. *Endocrine-Related Cancer*, *20*(4), 477–493. <https://doi.org/10.1530/ERC-12-0183>
- Dineen, R., Stewart, P. M., & Sherlock, M. (2016). Acromegaly – Diagnosis and Clinical Management. *QJM*, hcw004. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcw004>
- Dulubova, I. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: Role of munc18. *The EMBO Journal*, *18*(16), 4372–4382. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.16.4372>
- Dulubova, I., Lou, X., Lu, J., Huryeva, I., Alam, A., Schneggenburger, R., Südhof, T. C., & Rizo, J. (2005). A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: From priming to plasticity? *The EMBO Journal*, *24*(16), 2839–2850. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600753>
- Farh, K. K.-H., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B. P., Johnston, W. K., Lim, L. P., Burge, C. B., & Bartel,

- D. P. (2005). The Widespread Impact of Mammalian MicroRNAs on mRNA Repression and Evolution. *Science*, *310*(5755), 1817–1821. <https://doi.org/10.1126/science.1121158>
- Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, *19*(1), 92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- Houy, S., Streit, L., Drissa, I., Rame, M., Decraene, C., Moog, S., Brunaud, L., Lanoix, J., Chelbi, R., Bihain, F., Lacomme, S., Lomazzi, S., Campoli, P., Vix, M., Mutter, D., Paramithiotis, E., Dubessy, C., Vitale, N., Ory, S., & Gasman, S. (2022). Dysfunction of calcium-regulated exocytosis at a single-cell level causes catecholamine hypersecretion in patients with pheochromocytoma. *Cancer Letters*, *543*, 215765. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215765>
- Hu, S., Wang, H., Chen, K., Cheng, P., Gao, S., Liu, J., Li, X., & Sun, X. (2015). MicroRNA-34c Downregulation Ameliorates Amyloid- $\beta$ -Induced Synaptic Failure and Memory Deficits by Targeting VAMP2. *Journal of Alzheimer's Disease*, *48*(3), 673–686. <https://doi.org/10.3233/JAD-150432>
- Karagkouni, D., Paraskevopoulou, M. D., Chatzopoulos, S., Vlachos, I. S., Tastsoglou, S., Kanellos, I., Papadimitriou, D., Kavakiotis, I., Maniou, S., Skoufos, G., Vergoulis, T., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2018). DIANA-TarBase v8: A decade-long collection of experimentally supported miRNA–gene interactions. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D239–D245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1141>
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- Lattanzi, W., Bernardini, C., Gangitano, C., & Michetti, F. (2007). Hypoxia-like transcriptional activation in TMT-induced degeneration: Microarray expression analysis on PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, *100*(6), 1688–1702. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04331.x>
- Liu, Q., Tang, H., Liu, X., Liao, Y., Li, H., Zhao, Z., Yuan, X., & Jiang, W. (2014). miR-200b as a prognostic factor targets multiple members of RAB family in glioma. *Medical Oncology*, *31*(3), 859. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0859-x>
- López-Jiménez, E., Gómez-López, G., Leandro-García, L. J., Muñoz, I., Schiavi, F., Montero-Conde, C., De Cubas, A. A., Ramires, R., Landa, I., Leskelä, S., Maliszewska, A., Inglada-Pérez, L., De La Vega, L., Rodríguez-Antona, C., Letón, R., Bernal, C., De Campos, J. M., Díez-Tascón, C., Fraga, M. F., ... Cascón, A. (2010). Research Resource: Transcriptional Profiling Reveals Different Pseudohypoxic Signatures in SDHB and VHL-Related Pheochromocytomas. *Molecular Endocrinology*, *24*(12), 2382–2391. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0256>
- Onaitis, M. W., Kirshbom, P. M., Hayward, T. Z., Quayle, F. J., Feldman, J. M., Seigler, H. F., & Tyler,

- D. S. (2000). Gastrointestinal Carcinoids: Characterization by Site of Origin and Hormone Production. *Annals of Surgery*, 232(4), 549–556. <https://doi.org/10.1097/00000658-200010000-00010>
- Quillet, A., Anouar, Y., Lecroq, T., & Dubessy, C. (2021). Prediction methods for microRNA targets in bilaterian animals: Toward a better understanding by biologists. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 5811–5825. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.10.025>
- Rizo, J. (2022). Molecular Mechanisms Underlying Neurotransmitter Release. *Annual Review of Biophysics*, 51(1), 377–408. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-111821-104732>
- Salunkhe, V. A., Ofori, J. K., Gandasi, N. R., Salö, S. A., Hansson, S., Andersson, M. E., Wendt, A., Barg, S., Esguerra, J. L. S., & Eliasson, L. (2017). MiR-335 overexpression impairs insulin secretion through defective priming of insulin vesicles. *Physiological Reports*, 5(21), e13493. <https://doi.org/10.14814/phy2.13493>
- Segura, F., Brioso, M. A., Gómez, J. F., Machado, J. D., & Borges, R. (2000). Automatic analysis for amperometrical recordings of exocytosis. *Journal of Neuroscience Methods*, 103(2), 151–156. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(00\)00309-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00309-5)
- Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., & Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455(7209), 58–63. <https://doi.org/10.1038/nature07228>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Sharma, M., Burré, J., & Südhof, T. C. (2011). CSP $\alpha$  promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity. *Nature Cell Biology*, 13(1), 30–39. <https://doi.org/10.1038/ncb2131>
- Shvarts-Serebro, I., Sheinin, A., Gottfried, I., Adler, L., Schottlender, N., Ashery, U., & Barak, B. (2021). miR-128 as a Regulator of Synaptic Properties in 5xFAD Mice Hippocampal Neurons. *Journal of Molecular Neuroscience*, 71(12), 2593–2607. <https://doi.org/10.1007/s12031-021-01862-2>
- Stark, A., Brennecke, J., Bushati, N., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2005). Animal MicroRNAs Confer Robustness to Gene Expression and Have a Significant Impact on 3'UTR Evolution. *Cell*, 123(6), 1133–1146. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.023>
- Sudhof, T. C., & Rizo, J. (2011). Synaptic Vesicle Exocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), a005637–a005637. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005637>
- Sun, Y., Zhou, S., Shi, Y., Zhou, Y., Zhang, Y., Liu, K., Zhu, Y., & Han, X. (2020). Inhibition of miR-

153, an IL-1 $\beta$ -responsive miRNA, prevents beta cell failure and inflammation-associated diabetes. *Metabolism*, *111*, 154335. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154335>

Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Mering, C. von. (2019). STRING v11: Protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>

Thahouly, T., Tanguy, E., Raherindratsara, J., Bader, M.-F., Chasserot-Golaz, S., Gasman, S., & Vitale, N. (2021). Bovine Chromaffin Cells: Culture and Fluorescence Assay for Secretion. In F. Niedergang, N. Vitale, & S. Gasman (Eds.), *Exocytosis and Endocytosis* (Vol. 2233, pp. 169–179). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1044-2\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1044-2_11)

Tobaben, S., Thakur, P., Fernández-Chacón, R., Südhof, T. C., Rettig, J., & Stahl, B. (2001). A Trimeric Protein Complex Functions as a Synaptic Chaperone Machine. *Neuron*, *31*(6), 987–999. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00427-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00427-5)

Tokar, T., Pastrello, C., Rossos, A. E. M., Abovsky, M., Hauschild, A.-C., Tsay, M., Lu, R., & Jurisica, I. (2018). mirDIP 4.1—Integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D360–D370. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1144>

Verhage, M., & Sørensen, J. B. (2020). SNAREopathies: Diversity in Mechanisms and Symptoms. *Neuron*, *107*(1), 22–37. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.05.036>

Xie, F., Wang, J., & Zhang, B. (2023). RefFinder: A web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes. *Functional & Integrative Genomics*, *23*(2), 125. <https://doi.org/10.1007/s10142-023-01055-7>

Zandee, W. T., Kamp, K., Van Adrichem, R. C., Feelders, R. A., & De Herder, W. W. (2017). Effect of hormone secretory syndromes on neuroendocrine tumor prognosis. *Endocrine-Related Cancer*, R261–R274. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0538>







Supplementary Table 2 Gene sets significantly enriched by STRING-DB analysis

Gene set term	number of gene in the gene set	number of ExoDB gene in the gene set	False Discovery Rate (FDR)
Neurotransmitter secretion (GO 0007269)	175	64	1,72E-81
Signal release (GO 0023061)	618	70	6,17E-74
Chemical synaptic transmission (GO 0007268)	742	72	5,37E-70
Regulation of exocytosis (GO 00017157)	223	55	4,81E-68
Secretion by cell (GO 0032940)	1478	88	3,72E-66
Synaptic vesicle cycle (GO 0099504)	199	58	3,13E-65
Calcium ion regulated exocytosis (GO 0017156)	65	27	1,51E-63
Synaptic vesicle exocytosis (GO 0016079)	121	50	1,91E-63
Exocytosis (GO 0006887)	915	79	2,64E-59
Synapse (KW-0770)	472	53	2,37E-58
Regulation of secretion (GO 0051046)	747	63	3,74E-56
Regulation of secretion by cell (GO 1903530)	691	61	5,56E-55
Exocytosis (KW-0268)	69	32	1,44E-48
Regulation of regulated secretory pathway (GO 1903305)	162	41	6,98E-45
Regulated exocytosis (GO 0045055)	796	66	4,24E-44
Regulation of calcium ion dependant exocytosis (GO 0017158)	43	15	2,24E-41
Dopamine Neurotransmitter Release Cycle (hsa 212676)	23	21	1,03E-35
Modulation of chemical synaptic transmission (GO 0050804)	455	42	1,93E-34
Membrane fusion (GO 0061025)	171	26	4,61E-33
Vesicle fusion (GO 0006906)	103	23	1,95E-32
Positive regulation of exocytosis (GO 0045921)	92	23	5,52E-29
Calcium-ion regulated exocytosis of neurotransmitter (GO 0048791)	23	16	8,89E-29
Serotonine Neurotransmitter Release Cycle (hsa 181429)	18	16	2,30E-27
Regulation of neurotransmitter secretion (GO 0046928)	106	30	2,31E-26
Exocytic process (GO 0140029)	84	34	8,70E-26
Synaptic vesicle cycle (hsa 04721)	78	19	2,49E-25
Positive regulation of secretion (GO 0051047)	374	28	7,16E-25
Positive regulation of secretion by cell (GO 1903532)	347	27	1,77E-24
Positive regulation of regulated secretory pathway (GO 1903307)	56	16	3,41E-22
Acetylcholine Neurotransmitter Release Cycle (hsa 264642)	17	13	9,13E-22
Norepinephrine Neurotransmitter Release Cycle (hsa 181430)	18	13	1,40E-21
Glutamate Neurotransmitter Release Cycle (hsa 210500)	24	13	1,36E-20
Vesicle docking (GO 0048278)	65	22	3,87E-19
Positive regulation of synaptic transmission (GO 0050806)	176	18	5,74E-19
Positive regulation of calcium-ion dependant exocytosis (GO 0045956)	19	10	9,56E-17
Regulation of synaptic vesicle exocytosis (GO 2000300)	80	27	3,01E-16
Vesicle docking involved in exocytosis (GO 0006904)	43	18	3,70E-16
Regulation of synaptic vesicle cycle (GO 0098693)	114	32	2,52E-15
Synaptic vesicle fusion to presynaptic active zone membrane (GO 0031629)	23	17	1,64E-14
GABA synthesis, release, reuptake and degradation (hsa 888590)	19	10	7,83E-14
Synaptic vesicle docking (GO 0016081)	11	9	8,96E-12
Regulation of protein secretion (GO 0050708)	401	17	1,58E-10
Positive regulation of neurotransmitter secretion (GO 0001956)	23	8	3,12E-10
Synaptic vesicle priming (GO 0016082)	20	16	1,25E-09
Regulation of insulin secretion (GO 0050796)	182	12	2,75E-09
Regulation of vesicle fusion (GO 0031338)	32	14	9,86E-08
Positive regulation of protein secretion (GO 0050714)	207	9	7,64E-06
Hormone secretion (GO 0046879)	315	18	4,07E-05
Insulin secretion (hsa 04911)	86	6	0,00014
Regulation of hormone secretion (GO 0046883)	268	12	NS
Total	11963	1529	

Supplementary Table 3 ExoDB subnetwork analysis applied to the PCC

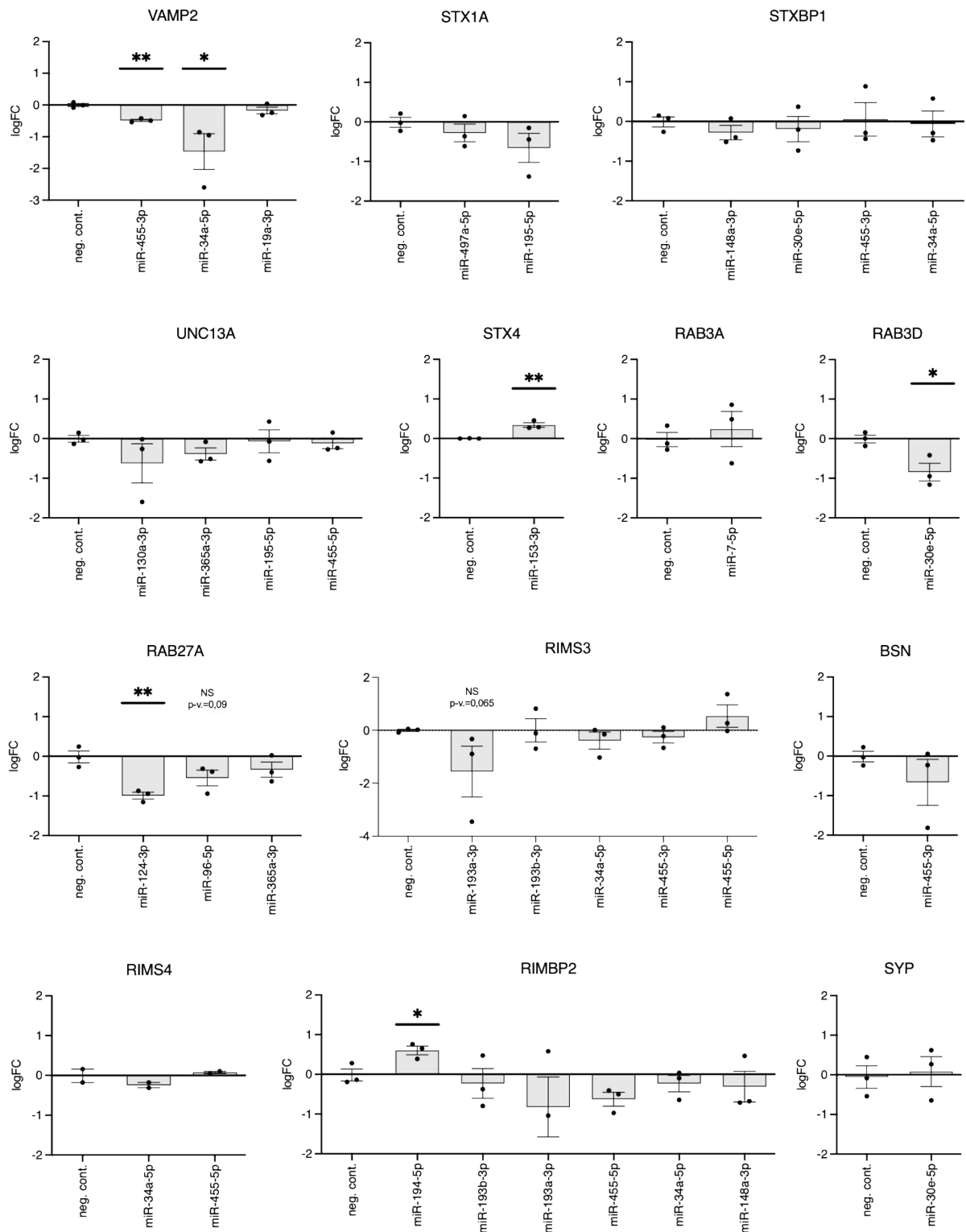
The ExoDB subnetwork applied to the PCC was analyzed using the NetworkAnalyzer plugin for Cytoscape, which performs an analysis of biological networks and calculates various topological parameters, including network diameter, average number of neighbors, and the number of connected pairs of nodes. We focused on the parameters "radianity," "stress," and "average shortest path length". Average Shortest Path Length represents the average number of steps along the shortest paths for all possible pairs of nodes in the network. The stress attribute counts the number of shortest paths through a particular node. It can be used to identify nodes that play a critical role in connecting different parts of the network. Radianity is a node centrality index calculated by subtracting the average shortest path length of a node from the diameter of the connected component plus 1. It measures how central a node is within the network.

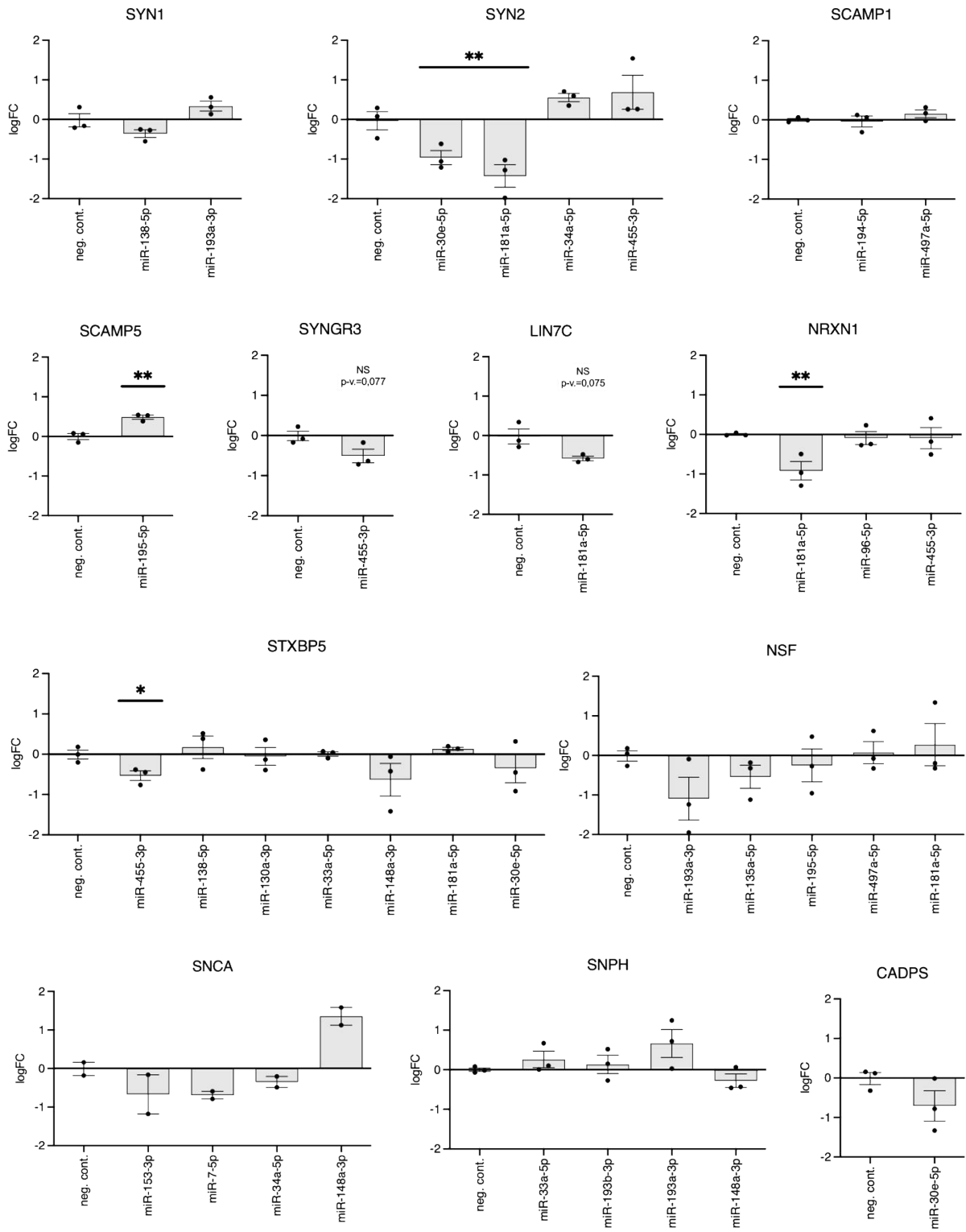
miRNA	Expression in PCC	Radianity	Number of interactions	Stress	Average Shortest Path Length
miR-424-5p	underexpressed	0,80684105	16	11666	2,35211268
miR-34a-5p	underexpressed	0,77464789	11	7306	2,57746479
miR-32-5p	underexpressed	0,77464789	11	6704	2,57746479
miR-181a-5p	underexpressed	0,77062374	10	5468	2,6056338
miR-148a-3p	underexpressed	0,7665996	9	5082	2,63380282
miR-455-3p	underexpressed	0,74647887	9	4448	2,77464789
miR-181b-5p	underexpressed	0,75050302	8	2846	2,74647887
miR-30e-5p	underexpressed	0,73843058	8	3174	2,83098592
miR-19a-3p	underexpressed	0,73843058	8	2410	2,83098592
miR-215-5p	overexpressed	0,722334	6	1776	2,94366197
miR-193a-3p	underexpressed	0,71428571	5	1370	3
miR-365a-3p	underexpressed	0,71026157	5	2222	3,02816901
miR-195-5p	underexpressed	0,71026157	6	1448	3,02816901
miR-455-5p	underexpressed	0,71428571	5	1010	3
miR-194-5p	overexpressed	0,70221328	4	934	3,08450704
miR-497-5p	underexpressed	0,69014085	4	722	3,16901408
miR-135a-5p	overexpressed	0,67404427	4	642	3,28169014
miR-130a-3p	underexpressed	0,67806841	2	184	3,25352113
miR-96-5p	underexpressed	0,65392354	4	814	3,42253521
miR-193b-3p	underexpressed	0,66599598	3	184	3,33802817
miR-33a-5p	underexpressed	0,66599598	2	116	3,33802817
miR-138-5p	overexpressed	0,65392354	2	238	3,42253521
miR-153-3p	overexpressed	0,54124748	2	1194	4,21126761
miR-7-5p	overexpressed	0,54124748	2	1194	4,21126761
miR-218-5p	overexpressed	0,58148893	1	0	3,92957746
miR-139-5p	underexpressed	0,58148893	1	0	3,92957746
let-7c-5p	underexpressed	0,58148893	1	0	3,92957746
miR-9-5p	overexpressed	0,5331992	2	122	4,26760563
miR-129-5p	overexpressed	0,55734406	1	0	4,09859155
miR-137	overexpressed	0,52515091	1	0	4,32394366
miR-124-3p	overexpressed	0,47283702	1	0	4,69014085

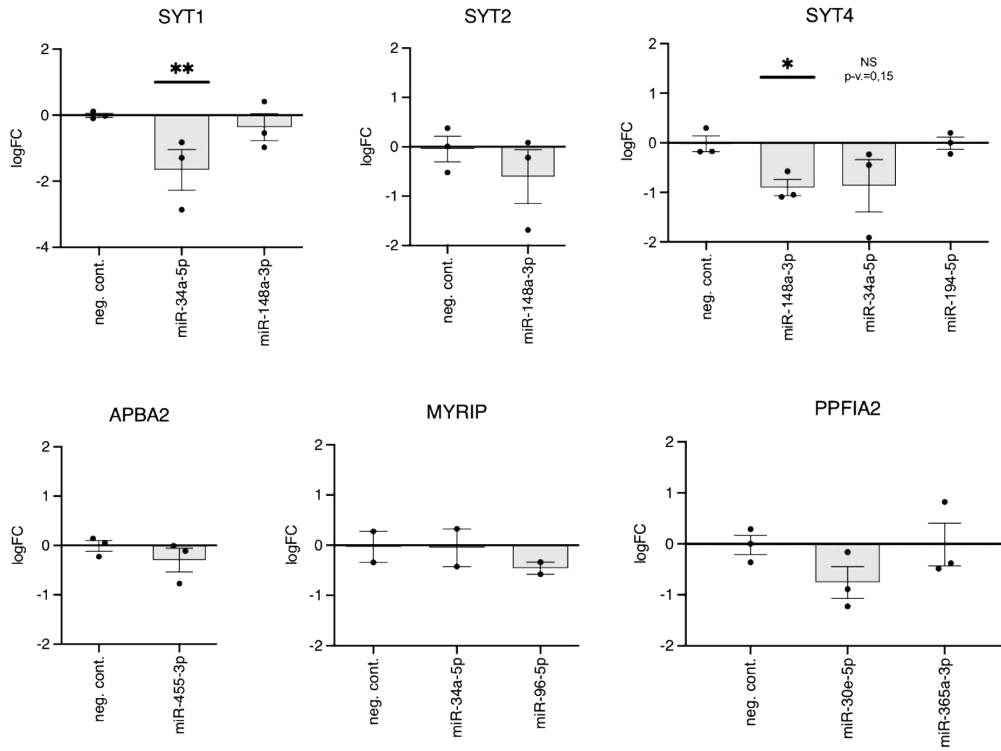
gene	Expression in PCC	Radiality	Number of interactions	Stress	AverageShortest PathLength
SYN2	overexpressed	0,79879276	8	5382	2,4084507
ERC2	overexpressed	0,78672032	8	5596	2,49295775
STXBP5	overexpressed	0,78672032	9	5310	2,49295775
RIMS3	overexpressed	0,77867203	8	3872	2,54929577
NSF	overexpressed	0,75855131	8	4060	2,69014085
STXBP1	overexpressed	0,77464789	6	3330	2,57746479
CASK	underexpressed	0,722334	7	4134	2,94366197
SYT4	overexpressed	0,74647887	5	1984	2,77464789
SNPH	overexpressed	0,72635815	6	1840	2,91549296
RAB27B	overexpressed	0,722334	6	1910	2,94366197
RIMBP2	overexpressed	0,722334	7	1896	2,94366197
PPFIA2	overexpressed	0,72635815	4	1194	2,91549296
RIMS1	overexpressed	0,722334	5	1814	2,94366197
SYT1	overexpressed	0,72635815	4	984	2,91549296
RAB3C	overexpressed	0,70221328	4	1220	3,08450704
SNCA	overexpressed	0,67806841	4	4824	3,25352113
SNAP23	underexpressed	0,69818913	3	1128	3,11267606
NRXN1	overexpressed	0,68209256	4	1064	3,22535211
STX1A	overexpressed	0,69014085	3	374	3,16901408
SCAMP1	overexpressed	0,66599598	4	1418	3,33802817
VAMP2	overexpressed	0,6861167	3	358	3,1971831
SYT2	overexpressed	0,69818913	2	240	3,11267606
UNC13A	overexpressed	0,67806841	4	598	3,25352113
RAB27A	underexpressed	0,61368209	4	1456	3,70422535
STXBP5L	overexpressed	0,68209256	2	194	3,22535211
RAB3D	overexpressed	0,68209256	2	186	3,22535211
CADPS2	underexpressed	0,65794769	3	288	3,3943662
LIN7C	underexpressed	0,64587525	3	1176	3,47887324
MYRIP	overexpressed	0,65794769	2	388	3,3943662
SCAMP5	overexpressed	0,65392354	2	98	3,42253521
RIMS4	overexpressed	0,6498994	2	102	3,45070423
PCLO	overexpressed	0,62977867	2	88	3,5915493
APBA2	overexpressed	0,6056338	1	0	3,76056338
SYN1	overexpressed	0,60160966	2	98	3,78873239
BSN	overexpressed	0,6056338	1	0	3,76056338
SYNGR3	overexpressed	0,6056338	1	0	3,76056338
SYP	overexpressed	0,59758551	1	0	3,81690141
CADPS	overexpressed	0,59758551	1	0	3,81690141
NAPB	overexpressed	0,58148893	1	0	3,92957746
STX4	underexpressed	0,40040241	1	0	5,1971831
RAB3A	overexpressed	0,40040241	1	0	5,1971831

Supplementary Figure 1 Evaluation of miRNA-mRNA interactions by RT-qPCR

Eighty ExoDB-derived miRNA-mRNA interactions predicted in PCC were assessed by RT-qPCR after transfection of miRNA mimics (10 nM). Results are expressed as the log<sub>2</sub> of the Fold Change (log<sub>2</sub>FC) of target genes for each predicted miRNA compared with the negative control (AllStar) (N=3, p-value: \*\* ≤ 0.01, \* ≤ 0.05, t-test).







## Discussion

Ces travaux de recherche s'inscrivent dans un contexte plus large visant à élucider les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents à la physiopathologie des PCC. Notre attention est particulièrement axée sur les processus responsables de l'induction et du maintien de l'hypersécrétion de catécholamines, une caractéristique clé de cette TNE. Nous évoquerons ainsi les forces et les limites des études menées jusqu'à présent, en mettant l'accent sur la pertinence des approches bio-informatiques et cellulaires développées. Nous discuterons également des perspectives de recherche qui découlent naturellement de ces résultats.

### 1. ExoDB, un outil pertinent pour l'identification de miARN régulateurs de l'exocytose ?

Pour la première étude, nous avons fait le choix de sélectionner deux processus cellulaires répertoriés parmi les termes de la gene ontology (GO), à savoir « regulated exocytosis #BPGO :0045055 » et « secretory granule #CCGO :0030141 » qui rassemblent environ 700 gènes (Houy et al., 2022). Pour la seconde étude, nous avons souhaité élargir et raffiner notre sélection de gènes évalués en exploitant 50 listes de gènes à partir des bases de données Gene Ontology, KEGG, Reactome et Uniprot. Celles-ci ont été sélectionnées à partir des mots clés « exocytosis », « exocytic », « secretion », « fusion » et « release » et elles regroupent 2510 gènes uniques. Il est important de noter que certaines des listes de gènes sélectionnées peuvent être incluses dans les deux listes globales de gènes utilisées lors de la première étude. Très rapidement, nous avons fait le constat qu'il était difficile de catégoriser finement les gènes associés à la sécrétion régulée en fonction de leur degré d'implication dans cette voie (informations partielles, modèles d'étude différents, etc). Ainsi, une approche par enrichissement d'ensembles de gènes via l'outil STRING-DB, appuyée par une analyse bibliographique approfondie, nous a permis d'identifier 95 gènes considérés comme essentiels à l'exocytose. Ceux-ci constituent donc une base solide pour l'étude de la sécrétion régulée et l'identification des miARN qui les ciblent.

Cette identification des ARNm cibles des miARN passe par l'utilisation de l'outil bio-informatique de prédiction mirDIP (v4.1) nous permettant d'identifier 210 miARN conservés ayant une forte probabilité d'interaction avec les ARNm sélectionnés (Tokar et al., 2018). Cet outil fournit près de 152 millions de prédictions de cibles de miARN collectées à partir de 30 ressources différentes. Chaque interaction est associée à un score intégratif afin de fournir une



mesure unifiée de confiance. Nous avons fait le choix de ne sélectionner que les interactions avec un indice de confiance élevé, « very high » et « high » afin de nous affranchir au mieux des faux positifs davantage présents dans les catégories « medium » et « low ». La contrepartie est que nous avons nécessairement omis de vraies interactions positives dont le score est plus faible. Nous avons alors exploité les données combinées de séquençage de miARN et d'ARNm provenant du TCGA (9 497 tumeurs de 30 types de cancers) via l'outil oncomiR afin de ne conserver que les 151 miARN dont l'expression est négativement corrélée avec leurs cibles potentielles (Wong et al., 2018). Nous avons décidé de ne conserver que les interactions identifiées simultanément par les outils mirDIP et oncomiR. Cette approche combinée vise à réduire le taux de faux positifs inhérent aux approches bioinformatiques concernant les miARN, mais également à restreindre notre identification à des miARN présentant une forte probabilité d'exercer un effet régulateur sur l'exocytose.

En privilégiant les miARN hautement conservés phylogénétiquement, l'étude se concentre sur des candidats qui sont susceptibles d'avoir des fonctions biologiques cruciales et de cibler des voies essentielles, telles que la sécrétion régulée. Cette observation s'est vérifiée en comparant la proportion des interactions validées expérimentalement assurées par les miARN identifiés (vrais positifs) par rapport aux interactions totales, ce critère étant généralement utilisé pour juger de la pertinence d'un outil bio-informatique de prédiction. Alors qu'ils représentent moins de 8% des miARN identifiés chez l'humain, les interactions impliquant les miARN « broadly conserved » concernent 39,98%, 29,1% et 49,65% des interactions identifiées pour les 95 gènes de l'exocytose, par les outils oncomiR, mirDIP et Tarbase respectivement.

## 2. Importance des bases de données transcriptomiques pour l'identification des gènes et des miARN dérégulés dans le PCC

Les bases de données PCPG du TCGA et du réseau français « Cortico et Médullosurrénale : les Tumeurs Endocrines » (COMETE) ont permis une avancée considérable dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie et de sa génétique singulière permettant notamment le développement d'une prise en charge personnalisée. En effet, le TCGA répertorie des données biochimiques, transcriptomiques, protéiques ou encore de méthylation pour 178 échantillons de PPGL associées aux données cliniques des 173 patients correspondant (Fishbein et al., 2017). COMETE contient des données transcriptomiques (ARNm, miARN), des données de méthylome ainsi que des analyses chromosomiques par puce d'hybridation génomique comparative (*comparative genomic hybridization array*, CGH array) issues de 188 échantillons

de PPGL, accompagnées d'informations cliniques (pour revue : (Favier et al., 2015)). L'absence d'échantillons de médullosurrénale saine dans ces bases de données ne nous permet pas de les exploiter pour notre étude. Dans la cohorte PPGL du TCGA, trois échantillons sont référencés comme des échantillons « normaux ». Toutefois, ces derniers proviennent du cortex surrénalien et non de la médulla. En ce qui concerne le projet « *Genotype-Tissue Expression* » (GTEx), il comporte 258 échantillons humains de cortex surrénalien mais pas de médullosurrénale.

Les données d'expression de miARN (GSE29742) et de gènes (GSE19422) utilisées dans notre étude comportent 6 échantillons de médullosurrénale saine chacune et respectivement 36 et 61 échantillons de PCC. Dans ce dernier, nous avons exclu l'échantillon GSM483021 de l'analyse du fait de son profil d'expression incohérent. Nous avons également fait le choix de ne pas sélectionner les échantillons de PGL bien qu'ils puissent être fonctionnels afin de s'affranchir de potentiels des biais associés à la localisation tissulaire. Ces données de microarray sont les seules disponibles à notre connaissance qui incluent des échantillons normaux. Les tumeurs analysées dans les deux genesets présentent des proportions différentes de mutations génétiques (Tableau 4). Cette disparité relative dans la représentativité des clusters génétiques du PPGL pourrait entraîner un biais d'analyse. Cependant, en ne faisant pas de distinction, nous mettons probablement en évidence les miARN et les gènes dérégulés généralement observés dans le PCC, indépendamment des altérations génétiques associées. De plus, la réduction de la taille des groupes entraîne également une diminution de la puissance statistique.

*Tableau 4 Répartition des mutations drivers identifiées dans les échantillons des GSE19422 et GSE29742*

	Cluster 1				Cluster 2		
	VHL	SDHB	SDHC	SDHD	RET	TMEM127	NF1
GSE19422 (gènes)	15	8	1	4	15	0	4
GSE29742 (miARN)	12	1	0	0	14	3	4

Au cours de notre étude, nous avons également observé des profils de sécrétion différents. En effet, l'analyse des paramètres ampérométriques effectuée sur les cellules de PCC de 22 patients comparativement aux échantillons non tumoraux a révélé une augmentation significative du nombre de spikes par cellule chez 16 de ces patients (73%). De plus, parmi ces 16 échantillons, des variations notables dans la sécrétion ont été observées, avec 11 d'entre eux présentant une augmentation allant jusqu'à deux fois, tandis que les cinq autres ont montré des augmentations

allant de plus de deux jusqu'à 3,4 fois. Il serait ainsi intéressant de réaliser une étude complémentaire à la nôtre en évaluant le profil d'expression des miARN en fonction des clusters afin d'identifier leur potentielle influence selon les profils de sécrétion spécifiques. Le workflow étant à présent bien établi, cette étude bio-informatique, pouvant inclure les données du TCGA et COMETE, pourrait être réalisée en quelques semaines. Nous envisageons également d'adapter le workflow que nous avons développé afin d'intégrer les données de méthylation de l'ADN disponibles. À ce sujet, nous avons déjà exploité une fraction de ces informations de méthylation pour compléter une étude récente réalisée par mon laboratoire. Nous avons alors mis en évidence l'expression illégitime du *Luteinizing hormone choriogonadotropin receptor* (LHCGR) à l'origine d'une libération excessive de catécholamines chez les femmes enceintes porteuses d'un PCC (Lopez et al., 2022).

### 3. Validation d'un réseau de miARN et de gènes impliqués dans l'exocytose

L'analyse différentielle de ces deux genesets combinée aux informations rassemblées dans ExoDB, nous a permis d'établir un réseau de 154 interactions entre 31 miARN et 41 ARNm, dérégulés dans le PCC humain par rapport à la glande médullo-surrénale saine. Expérimentalement, 20 de ces miARN inhibent la sécrétion régulée ce qui correspond à 80 interactions potentielles. Treize d'entre elles ont été validées par RT-qPCR. Cette différence peut s'expliquer par la présence de faux positifs à la suite des analyses bioinformatiques et/ou par un manque de puissance statistique liée aux expériences de RT-qPCR. En effet, seules trois expériences indépendantes au format 384 puits ont pu être effectuées. Plusieurs autres interactions (ex : miR-455-3p et SYNGR3, miR-181a-5p et LIN7C et miR-34a-5p et SYT4) semblent effectives sans pour autant être significatives, il serait donc intéressant d'augmenter le nombre de réplicats indépendants afin d'évaluer plus précisément l'effet des miARN fonctionnels sur leurs ARNm cibles impliqués dans l'exocytose.

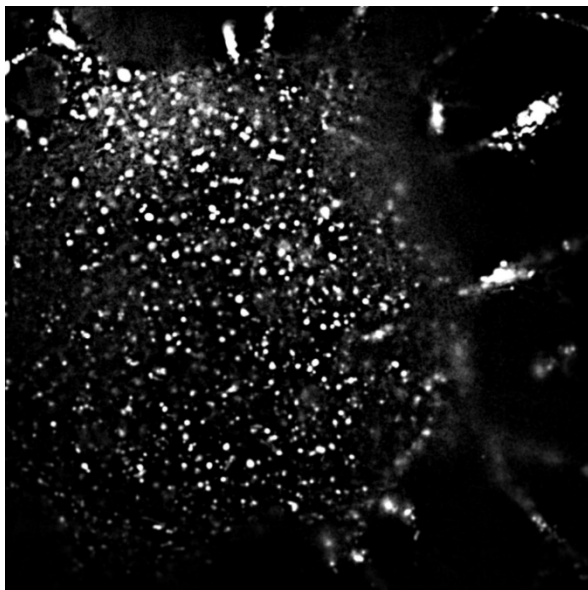
L'absence d'évaluation de l'effet des miARN d'intérêt au niveau protéique constitue actuellement une limite de notre étude. La dégradation des ARNm cibles représente, à l'état stable, la majeure partie (66-90%) de la répression médiée par les miARN observée dans les cellules de mammifères en culture (Eichhorn et al., 2014). Toutefois, l'absence d'un effet transcriptionnel du miARN ne permet pas pour autant d'exclure un effet au niveau protéique, certains miARN pouvant réprimer la traduction sans déstabiliser l'ARNm. Nous sommes donc en train de valider par western-blot certaines des interactions majeures mises en évidence (exemple : miR-34a-5p et VAMP2) afin de conforter nos résultats au niveau protéique. Nous

envisageons également de confirmer certaines interactions clés par des essais de rapporteur luciférase-3'UTR, cette méthode permettant la mise en évidence d'une interaction directe entre un miARN et son ARNm cible.

#### 4. Approfondissement de l'évaluation du rôle des miARN dans la sécrétion régulée

L'effet inhibiteur de *rno-miR-34a-5p* sur la sécrétion des cellules PC12-2luc a été corroboré par une approche d'ampérométrie à fibre de carbone réalisée par l'équipe du Dr Stéphane Gasman (INCI, Strasbourg). Très sensible, l'ampérométrie permet la détection d'évènements d'exocytose via la détection directe des catécholamines sécrétées avec une résolution temporelle de l'ordre de quelques dixièmes de millisecondes. Toutefois, le temps d'analyse des enregistrements étant important, le faible débit de cette méthode ne nous a pas permis d'étudier l'ensemble des miARN identifiés. Nous envisageons toutefois de compléter ce travail en analysant les effets d'un miARN de chaque groupe (régulateur de la sécrétion basale et régulateur de la sécrétion stimulée). Ainsi, l'identification de profils de pics propres à chacun des miARN et à leurs groupes respectifs, pourrait permettre de mettre en lumière des différences dans la dynamique du pore de fusion au sein de ces groupes.

Nous développons aussi depuis quelques mois une approche par microscopie *total internal reflection fluorescence* (TIRF) à l'aide de deux rapporteurs de la sécrétion, NPY-mCherry-pHluorin et Vamp2-pHmScarlet afin d'approfondir l'évaluation de différents aspects moléculaires de la sécrétion régulée par les miARN (Figure 21). Aussi connue sous le nom de microscopie à onde évanescente, cette technique exploite le phénomène de réflexion totale interne de la lumière (Fish, 2009). La microscopie TIRF repose sur la création d'un champ d'éclairage évanescent près de l'interface entre la lame de verre et l'échantillon. L'intensité de l'onde évanescente décroît exponentiellement avec la distance de la surface, de sorte que seules les molécules fluorescentes situées à moins de 200 nm de la surface sont efficacement excitées. Elle permet donc l'imagerie de haute résolution de molécules isolées à l'échelle nanométrique avec un rapport signal-bruit élevé ce qui en fait une technique particulièrement adaptée à l'étude de processus dynamiques à la surface des cellules, tels que l'exocytose.



*Figure 21* Cellule PC12 transfectée avec le rapporteur rouge VAMP2-pHmScarlet

Les cellules sont observées 72h après la transfection du plasmide à l'aide d'un microscope TIRF (CellVivo IX83, Coherent,  $\lambda_{ex}=561$  nm,  $\lambda_{em}=585$  nm) avec un objectif à immersion 100x. Les films sont acquis pendant 2 min à une fréquence de 10Hz puis les images des films sont déconvoluées. Typiquement, plusieurs centaines de vésicules (points blancs) sont observées pour chaque cellule. La détection et l'analyse des événements individuels d'exocytose est réalisée avec le plug-in ExoJ pour ImageJ (J. Liu et al., 2022).

Le développement de ces outils devrait nous permettre de consolider nos résultats sur un plus grand nombre de miARN. De plus, l'enregistrement étant réalisé à l'échelle de la cellule unique, cette approche est particulièrement adaptée pour l'évaluation des miARN d'intérêt sur des échantillons de patients très précieux et restreints.

## 5. miR-34a-5p, un microARN suppresseur de tumeur ?

Parmi les nombreux miARN régulateurs de l'exocytose identifiés dans notre étude, nous avons approfondi l'évaluation de miR-34a-5p dont l'implication dans plusieurs types de cancers est largement décrite. Situé chez l'humain sur le chromosome 1 (1p36) et appartenant à la famille miR-34a/b/c, miR-34a-5p est l'un des miARN dont le rôle est le plus étudié dans la littérature avec plusieurs dizaines de cibles expérimentalement identifiées. Ce dernier est décrit comme un miARN suppresseur de tumeurs et de métastases. En effet, sa sous-expression favorise les processus associés au développement tumoral dont le cycle cellulaire et la TEM tout en réprimant ceux qui inhibent la carcinogenèse tels que l'apoptose ou encore la sénescence (L. Zhang et al., 2019). Réduite en silence dans différents cancers, l'expression de *hsa-miR-34a-5p* est activée transcriptionnellement par p53 qui joue un rôle central dans la régulation de la décision d'induire l'apoptose ou favoriser la survie cellulaire (Vousden & Prives, 2009). Le gène TP53, responsable de la production de la protéine p53, est fréquemment muté dans les

cancers, avec des mutations homozygotes dans 50 à 60% des cas de cancers humains (Baugh et al., 2018). De plus, la signalisation de p53 est dysfonctionnelle dans plus de 80% des tumeurs (Levine et al., 2004). À ce sujet, il est admis que les changements d'expression dans 15% des gènes de la voie p53 après son activation en réponse à des signaux de stress sont attribuables aux miARN (Hermeking, 2012). Ainsi, p53 régule l'expression de miR-34a-5p en agissant sur des sites de liaison spécifiques sur le promoteur de celui-ci contrairement aux autres membres de la famille (Okada et al., 2014). Une boucle de rétroaction positive entre p53 et miR-34a-5p a été démontrée. En effet, miR-34a-5p réprime l'expression de Mdm4, un inhibiteur de p53. De ce fait, l'axe p53/miR-34a-5p est défini comme un médiateur central de la suppression tumorale.

L'administration ou la réexpression de miARN dans les tumeurs peut représenter une stratégie efficace pour les futurs traitements contre le cancer, sous réserve du respect de critères rigoureux notamment une administration sûre, une limitation des effets off-target liés aux mécanismes d'action des miARN, ainsi que de la réduction de la toxicité et des réponses immunitaires (Reda El Sayed et al., 2021). À ce propos, l'approche la plus courante pour l'administration de miARN repose sur des nanoparticules à base de lipides, couplées à des vecteurs exprimant des miARN ou à des mimics de miARN matures. Une répression de la croissance tumorale, allant de 20 à 83%, est notamment observée après administration systémique intra-tumorale ou intraveineuse de miR-34a-5p. Ces observations ont été faites sur des modèles de xénogreffes ou de souris génétiquement modifiées et incluaient des formes de mélanome, lymphome, myélome multiple, cancer du sein, de la prostate, du pancréas et du poumon non à petites cellules (Bader, 2012). Justement, la première thérapie basée sur l'utilisation d'un miARN chez l'humain correspond à l'administration de *hsa*-miR-34a-5p dans le traitement de patients à un stade avancé du cancer du foie métastatique. Malgré des résultats préliminaires prometteurs quant à la tolérance du traitement et des preuves d'activité antitumorale, l'essai clinique s'est brusquement arrêté à la suite d'effets indésirables sévères aboutissant au décès de trois des 85 participants de l'étude (Hong et al., 2020). Ce n'est que très récemment que la possibilité d'un traitement anticancéreux à base de miR-34a-5p a été réenvisagée en introduisant plusieurs modifications (2'-O-Me, 2'-O-F, PS linkage) visant à améliorer fortement sa stabilité tout en réduisant l'effet off-target à l'aide de brins asymétriques (Abdelaal et al., 2023). La conjugaison du miARN au folate, permettant une délivrance ciblée aux cellules tumorales exprimant le récepteur au folate (surexprimé dans de nombreux cancers dont le cancer colorectal, du sein, du poumon ou encore de l'ovaire), a montré une inhibition

significative de la prolifération et l'invasion tumorale *in vivo*. Ces résultats réouvrent ainsi des perspectives pour le développement de traitements plus efficaces et ciblés à base de miARN et notamment miR-34a-5p. Finalement, de nouvelles stratégies basées sur la nanovectorisation des miARN offrent des perspectives prometteuses pour orienter le développement de thérapies innovantes (Reda El Sayed et al., 2021).

Toutefois, la perception de miR-34a-5p comme un suppresseur de tumeur a été récemment remise en question. En effet, Mocky et coll. proposent que les miARN catégorisés comme tel doivent montrer des signes d'inactivation génétique ou épigénétique dans les cancers (Mockly et al., 2022). Or, *hsa-miR-34* ne semble pas être régulé à la baisse dans les tumeurs primaires comparé aux tissus adjacents. Il est important de souligner que cette étude n'inclue pas d'échantillons provenant de PPGL. De plus son action antiproliférative observée lors d'une transfection supra-physiologique n'est pas retrouvée pour des niveaux endogènes de miR-34a.

## 6. Implication des miARN dans l'hypertension artérielle

Finalement, il est intéressant de souligner qu'un lien entre les miARN et l'hypertension a déjà été établi dans un contexte non cancéreux. C'est notamment le cas de *rno-miR-22*, identifié par un polymorphisme de son site de liaison situé dans le 3'-UTR de la CgA, dans un modèle de rat spontanément hypertendu (*spontaneously hypertensive rat*, SHR) (Friese et al., 2013). Ces données corrélaient avec des taux élevés de la protéine dans le plasma et la glande surrénale et des taux réduits dans le système nerveux central à l'origine de la pathogenèse de l'hypertension dans le modèle SHR. Ainsi, l'administration *in vivo* d'un antagoniste *rno-miR-22* aux animaux SHR entraîne une réduction de leur pression artérielle d'environ 18 mmHg, ouvrant ainsi une nouvelle voie thérapeutique pour l'hypertension. Également chez le rat SHR, *rno-miR-145* a été mis en évidence comme un médiateur clé dans la pathogenèse de l'hypertension en ciblant le *solute carrier family 7 member 1* (SLC7A1) (Y. Wang & Jin, 2017). Par conséquent, des changements de la production de facteurs vasodilatateurs tels que le monoxyde d'azote pourraient entraîner une altération de la fonction endothéliale susceptible conduire à l'hypertension. Ces résultats suggèrent que ce miARN représente également une cible potentielle pour le traitement de cette pathologie. De la même façon, un polymorphisme nucléotidique (*single nucleotide polymorphisme*, SNP), rs938671 dans la région 3'UTR de l'ARNm codant l'*ATPase H<sup>+</sup> transporting V0 subunit A1* (ATP6V0A1), crée un motif de liaison pour le *rno-miR-637* ce qui a pour conséquence de réprimer l'expression du gène (Z. Wei et al., 2011). Or l'ATP6V0A1 exerce un rôle majeur dans l'acidification des organites

intracellulaires dont les GSCD ce qui entraîne une diminution du tri, de la rétention et de la maturation du contenu des granules telles que les catécholamines.

## 7. Quid des autres cibles des miARN d'intérêt ?

Nous avons restreint notre analyse, dans un premier temps, à une identification de miARN différentiellement exprimés, régulateurs de gènes de l'exocytose également différentiellement exprimé dans le PCC. Il serait maintenant intéressant d'élargir notre analyse en identifiant d'autres gènes régulés par les miARN inhibiteurs de la sécrétion. À ce sujet, de nombreuses études ont rapporté une régulation à la hausse de l'ARNm ou des protéines contrôlant la synthèse des catécholamines à l'origine de l'augmentation des niveaux de catécholamines dans les tissus de PCC (Eisenhofer et al., 2001, 2008; Isobe et al., 1998). Nous avons également constaté dans notre première étude, que la TH, l'AADC et la DBH sont significativement surexprimées aux niveaux transcriptomique et protéique dans le PCC (Houy et al., 2022). L'hypersécrétion de catécholamines observée peut résulter, en outre, d'une amélioration de l'efficacité des processus précédant l'exocytose, incluant le stockage subcellulaire des catécholamines et le transport des vésicules vers la membrane plasmique. Parmi les cibles potentielles, nous avons identifié des gènes impliqués dans la granulogénèse des GSCD notamment CgA, CgB, SgII, SgIII et SgV, qui étaient également surexprimés dans notre étude (Houy et al., 2022). De même, une forte augmentation du niveau d'expression de VMAT1 et VMAT2, responsables du transport actif des catécholamines dans le granule, a été observée tandis que les MAOA et B, impliquées dans la dégradation des catécholamines, étaient régulées à la baisse. Cependant, la charge moyenne par cellule de PCC n'a pas augmenté par rapport aux cellules tumorales, suggérant que chaque GSCD ne contient pas une quantité accrue de catécholamines par rapport aux cellules non-tumorales. Par conséquent, nous formulons l'hypothèse que cette production excessive de catécholamines et cette surexpression des transporteurs de monoamines pourrait contribuer à une augmentation globale du nombre de GSCD dans le PCC. Dans ce contexte, il serait utile d'analyser la densité et la répartition des GSCD au niveau subcellulaire, ainsi que divers paramètres cinétiques associés, en recourant à des méthodes de microscopie électronique, confocale à balayage laser ou encore de super-résolution. Ceci permettrait de détecter d'éventuelles perturbations dans le nombre de GSCD et leur transport.

Afin d'évaluer de manière approfondie l'implication des miARN dans la régulation des voies de transport, l'utilisation de systèmes de synchronisation tels que le système *retention using*



*selective hooks* (RUSH) pourrait s'avérer intéressant (Boncompain et al., 2012). Ce système repose sur le maintien d'une protéine d'intérêt destinée à être sécrétée dans le RE, grâce à son interaction réversible avec un « crochet moléculaire ». La libération conditionnelle de la protéine permet ainsi de synchroniser le trafic et de comparer les cinétiques et les voies de transports empruntées. En combinant cette approche à une immobilisation sélective de la protéine synchronisée, cet outil permet également d'évaluer l'activité d'exocytose (Boncompain et al., 2021).

## 8. Quid des autres régulateurs épigénétiques et post-transcriptionnels ?

Un degré de complexité supplémentaire est apporté en prenant en considération l'impact des régulateurs épigénétiques et d'autres modulateurs de l'expression génique tels que les lncARN, les circARN, et les facteurs de transcription (FT) dont l'implication dans la physiopathologie du PPGL est établie (section 2.2.8). À l'instar des miARN, les FT peuvent agir comme des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs en influençant la transcription de l'ARNm via la liaison de régions promotrices (Zhao et al., 2016). De plus, les FT et les miARN peuvent se réguler mutuellement formant une boucle de rétrocontrôle (*feedback loop*, FBL) (Figure 22). Lorsqu'ils corégulent également un même gène, on parle alors une boucle de feed-forward (*feed-forward loop*, FFL) constituant une unité de régulation importante pouvant former davantage de réseaux de régulation des gènes.

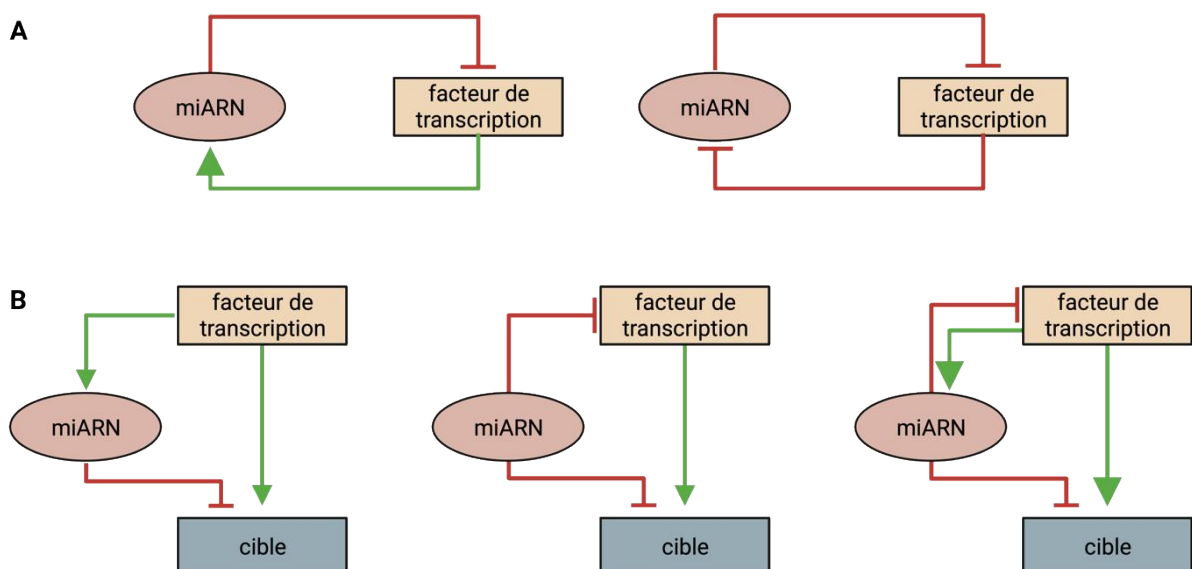


Figure 22 Schéma des différentes boucles de régulations possibles entre un miARN et un facteur de transcription (A) et entre un miARN, un facteur de transcription et une cible commune (B)

Outre le gène *onecut2*, impliqué dans la sécrétion des cellules  $\beta$ -pancréatiques (section 3.8), peu d'études se sont intéressées aux facteurs de régulation impliqués les mécanismes d'exocytose. Cependant, le rôle du facteur de transcription répresseur *RE-1 silencing transcription factor* (REST) est bien établi. L'acquisition de la fonction neurosécrétoire des neurones et cellules neuroendocrines se produit au cours de leur différenciation cellulaire. Cette progression dépend d'un réseau de signalisation complexe orchestré par le facteur REST. En reconnaissant la séquence *repressor element 1* (RE-1) présente dans les régions promotrices de gènes cibles, il réduit leur expression en silence par une répression de la transcription. Ce facteur inhibiteur des gènes neuronaux est exprimé à des niveaux élevés et stables dans les cellules non-sécrétoires. Son expression chute drastiquement lors de l'acquisition du phénotype sécrétoire des cellules neuronales et neuroendocrines. Cette perte d'expression corrèle également avec l'expression des gènes essentiels à cette fonction sécrétoire et porteurs de la séquence RE-1. Des études ont montré que ce facteur était faiblement exprimé dans les cellules PC12 sauvages, dotées d'une voie de sécrétion fonctionnelle (D'Alessandro et al., 2009). De plus, l'augmentation de l'expression de REST dans ces cellules, par transfection stable, entraîne la répression de certains gènes associés à la neurosécrétion dont la DBH, la synaptophysine, la synapsine1 ou encore les synaptotagmines II, IV et VII et Snap25 (Ekici et al., 2008; Ishiguro et al., 1993). Il en résulte une diminution de la taille et de la densité des vésicules de sécrétion dans les cellules PC12 (Garcia-Manteiga et al., 2019). Ainsi, la diminution de l'expression de REST ou l'inhibition des histones désacétylases, des enzymes effectrices majeures de REST, permet de rétablir la morphologie et la composition moléculaire des vésicules de sécrétion. Dans le PCC humain, REST est sous-exprimé (GSE19422,  $\log_2(\text{FC})$  : -0.639, p-value : 6.48e-07, p-value ajustée : 1.59e-5) ce qui pourrait favoriser la surexpression des gènes associés à la neurosécrétion et ainsi favoriser la suractivation de la voie de la sécrétion régulée. REST fait partie des 2510 gènes de l'exocytose identifiés dans notre étude avec 14 citations dans les 50 listes de gènes. Toutefois, puisque notre analyse bibliographique visait à identifier les protéines directement impliquées dans le mécanisme de l'exocytose, nous n'avons pas inclus ce gène dans la suite de l'étude. Cette observation est d'autant plus intéressante que la répression de REST peut passer par des miARN tels que miR-124a. Or, dans notre étude, nous avons mis en évidence le rôle inhibiteur majeur (>70%) de ce miARN dans la sécrétion régulée.

## 9. La lignée PC12-2luc, un outil cellulaire de quantification de la sécrétion régulée

Dans le but d'évaluer l'effet des miARN sur l'activité de l'exocytose, nous avons développé un test fonctionnel basé sur l'expression stable d'un rapporteur luminescent localisé spécifiquement dans les GSCD et dans une lignée cellulaire PC12 (PC12-2luc). La lignée PC12, isolée d'un phéochromocytome de rat en 1976, est largement utilisée pour des études relatives à la physiologie des cellules neuronales et endocrines (Greene & Tischler, 1976). Ces cellules présentent deux ensembles distincts de vésicules, des petites d'environ 40 nm contenant de l'acétylcholine et de plus grandes d'environ 100 nm stockant des monoamines (Tischler & Greene, 1978). Le contenu de ces dernières, majoritairement dopaminergique et dans une moindre mesure noradrénergique, est libéré lors de la dépolarisation dépendante du calcium (Greene & Rein, 1977).

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la voie de sécrétion régulée, y compris l'exocytose, des méthodes de mesure de l'activité sécrétoire des cellules PC12 ont été développées (Martin & Grishanin, 2003). Parmi celles-ci, on retrouve classiquement la quantification des catécholamines sécrétées, la dopamine et dans une moindre mesure la noradrénaline, basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux par ELISA ou encore sur la mesure de la libération de catécholamines radiomarquées par dosage radio-immunologique. Au cours des dernières années, des tests basés sur l'expression de rapporteurs fluorescents et bioluminescents fusionnés à des gènes d'intérêt ont été développés et utilisés pour la quantification d'événements cellulaires. En particulier, cette technique a été appliquée à l'étude de la voie de sécrétion régulée des cellules PC12 avec, par exemple, la mesure de l'activité d'exocytose après transfection transitoire du rapporteur de la sécrétion régulée CgA-EAP (Taupenot, 2007). Ces tests présentent toutefois des limites conséquentes quant à leur sensibilité, leur sécurité, leur coût ainsi que la mise en place et la durée nécessaire à leur réalisation.

Afin de palier à ces limitations, nous avons utilisé une nouvelle Nano-luciférase (Nluc) pour mesurer l'activité sécrétoire des cellules PC12. La Nluc présente plusieurs avantages et notamment une taille réduite, ce qui favorise la localisation vésiculaire du rapporteur, une stabilité et une sensibilité accrues, la luminescence étant environ 100 à 150 fois supérieure à une luciférase classique. À cette fin, le gène Nluc a été fusionné avec l'hormone de croissance humaine (*human growth hormone 1*, hGH1) qui est spécifiquement localisée dans les vésicules

de sécrétion à cœur dense, puis exprimé dans une lignée de cellules PC12 (PC12-Nluc). La petite taille de la Nluc (513 pb) facilite le développement d'une lignée cellulaire stable exprimant le rapporteur bioluminescent. L'un des avantages de la Nluc est que son activité est peu affectée par l'environnement acide des GSCD (pH=5-5,5). Par ailleurs, la localisation vésiculaire du rapporteur a été vérifiée par immunocytochimie (données non montrées). Ce rapporteur est sécrété en réponse aux sécrétagogues conventionnels et dans des proportions équivalentes à la dopamine sécrétée par ces cellules faisant de ce dernier un bon indicateur de l'activité de la sécrétion régulée (données non montrées). Nous avons également transfecté un second plasmide permettant aux cellules PC12 d'exprimer de façon stable une Firefly luciférase (Fluc) dans le cytosol. L'ensemble de ces données indiquent que la lignée PC12-2luc est un modèle de choix pour étudier la sécrétion régulée par le calcium.

Après optimisation des conditions expérimentales, nous avons montré que la sensibilité du test (environ 30 cellules) permet de mesurer l'activité de sécrétion de quelques centaines de cellules cultivées en plaque 384 puits. Pour des raisons pratiques et de reproductibilité, nous avons travaillé en plaque de 96 puits (P96). Dans ces conditions, les coûts sont 40 à 50 fois inférieurs à ceux d'une mesure de dopamine en ELISA et les mesures sont réalisées en moins de 20 minutes au lieu de deux jours. Cette miniaturisation nous a donc permis d'augmenter le débit des analyses et de réduire la quantité de consommables, en particulier en ce qui concerne les transfections de miARN et de siARN contrôles. Ainsi, au regard de la grande sensibilité de notre test où théoriquement le contenu d'une cellule est détectable ( $137,5 \pm 15$  RLU), une miniaturisation en P384 pourrait être envisagée ce qui permettrait d'augmenter drastiquement le débit d'analyse tout en réduisant encore les quantités de consommables utilisées. Notre test est également reproductible, notamment grâce à l'expression stable du plasmide, évitant ainsi les transfections qui altèrent la membrane plasmique et donc influencent potentiellement le processus d'exocytose. Cette lignée cellulaire constitue donc une ressource de criblage permettant d'évaluer à moyen débit l'impact des miARN sur la sécrétion. À cet égard, les méthodes de criblage sont communément utilisées dans l'exploration du rôle des miARN dans divers processus dont l'apoptose ou la prolifération cellulaire par exemple (Vernon et al., 2020; Veys et al., 2023).

Nous avons constaté qu'une petite quantité de ce rapporteur *hGH1-Nluc* est libérée dans le milieu de culture comme cela se produit physiologiquement avec les catécholamines. Avec une demi-vie supérieure à 4 jours à 37°C, cette nouvelle luciférase est stable dans le milieu de culture. Ainsi, nous avons exploité cette caractéristique pour suivre la sélection des cellules

transfectées en mesurant l'activité de la luciférase directement à partir du milieu. De même, l'inhibition de la sécrétion basale (au repos) par un miARN entraîne l'accumulation du rapporteur dans la cellule. La quantité de Nluc par cellule est alors normalisée avec celle de la Fluc exprimée de façon stable dans le cytosol afin de prendre en compte le nombre de cellules dans le puits de mesure.

De cette manière, nous avons identifié 3 groupes de miARN qui se distinguent par leurs effets différents sur la sécrétion. Ainsi, parmi ces 20 miARN, 14 régulent la sécrétion stimulée (ici par le baryum en l'occurrence), 10 régulent la sécrétion basale et 4 d'entre eux exercent un effet à la fois en conditions stimulée et basale. Nous nous interrogeons toutefois sur les acteurs protéiques impliqués dans cette régulation de la sécrétion basale. Les quelques données de la littérature à ce sujet rapportent qu'elle pourrait être liée à la quantité intracellulaire de calcium (Westerink & Ewing, 2008). Dans ce cas, les miARN d'intérêt pourraient influencer ce taux en modulant directement l'expression des canaux calciques. Toutefois, lors de la 1<sup>ère</sup> étude de ce travail nous n'avons pas observé de changement d'expression des canaux calciques membranaires dans le PCC (Houy et al., 2022). Nous savons également que la sécrétion de catécholamines et le désassemblage du cortex d'actine sont étroitement couplés dans les cellules chromaffines. En effet, alors que les GSCD appartenant au pool RRP sont amarrées aux membranes plasmiques et prêts à fusionner en réponse à l'entrée de calcium, un deuxième groupe de GSCD est situé plus en retrait, à l'intérieur du cortex d'actine. La sécrétion du contenu de ce deuxième groupe implique le désassemblage transitoire des filaments d'actine par des protéines de sectionnement et la translocation vers les sites d'exocytose. À ce propos, il a été démontré que les opioïdes suppriment la sécrétion basale de catécholamines, rapidement et de façon transitoire, à la suite d'une stabilisation de l'actine corticale (Dermitzaki et al., 2001). Il serait ainsi intéressant d'évaluer ces paramètres après transfection de nos miARN d'intérêt et marquage de l'actine des cellules PC12-2luc. Nous avons fait le choix de ne pas inclure de gènes impliqués dans le cortex d'actine dans notre base de données ExoDB. Il serait toutefois intéressant d'évaluer s'ils représentent des cibles potentielles des miARN d'intérêt. Enfin, l'utilisation d'un rapporteur dont le gène est sous le contrôle d'un promoteur fort (CMV) exclue l'hypothèse que cette accumulation soit la conséquence d'une augmentation de la synthèse de celui-ci. Elle est toutefois envisageable dans le cas d'une dérégulation de la sécrétion basale de catécholamines par les cellules de PCC. Cette caractéristique peut être appréhendée par l'évaluation de la charge granulaire par ampérométrie à fibre de carbone. Or nous avons démontré que pour l'un des miARN d'intérêt, miR-34a-5p, celui-ci ne régule pas la

biosynthèse de catécholamines puisque la charge de catécholamines par GSCD des cellules chromaffines bovines reste inchangée.

Cet outil permettant la quantification de la sécrétion régulée est aisément transposable à d'autres lignées cellulaires et notamment la lignée MPC issue d'un PCC de souris KO pour le gène NF1 (J. F. Powers et al., 2000). Les principaux avantages de cette lignée sont qu'elle présente des ressemblances génétiques et biochimiques avec les PCC humains telles qu'une expression du récepteur tyrosine kinase Ret, et surtout de la PNMT leur permettant de synthétiser et sécréter de l'adrénaline (J. Powers, 2002). Aussi, contrairement à nos cellules PC12 qui ont un temps de doublement relativement court (24-28h), les cellules MPC prolifèrent plus lentement (48h) et sous forme de colonies *in vitro*. Leur capacité à proliférer étant conservée *in vivo*, elles seraient ainsi particulièrement adaptées pour l'évaluation de l'effet des miARN sur la sécrétion de catécholamines dans un modèle d'allogreffes chez la souris nude. Notre équipe disposant d'une expertise à ce sujet, il serait intéressant de surexprimer ou d'inhiber un miARN d'intérêt à l'aide d'un système d'expression inductible par la doxycycline. Il serait ensuite pertinent de mesurer les métabolites des catécholamines urinaires par ELISA et d'évaluer les paramètres hémodynamiques des souris. En point final, les tumeurs prélevées seraient exploitées afin d'évaluer l'expression des miARN endogènes et de leurs ARNm cibles par RT-qPCR et l'expression des protéines cibles par western blot.

L'une des limites de notre étude correspond à l'utilisation d'un modèle cellulaire de rat pour l'évaluation de miARN identifiés chez l'être humain. Nous avons tenté de remédier à ce biais en utilisant la lignée cellulaire hPheo1, dérivant d'un PCC sporadique humain, immortalisée par l'expression stable de la protéine *humain telomerase reverse transcriptase* (*hTERT*) (Ghayee et al., 2013). Ces cellules expriment des marqueurs neuroendocrines tels que la CgA et la PNMT mais sans expression significative des autres enzymes impliquées dans la synthèse des catécholamines. Cette lignée est ainsi décrite comme provenant d'une population sous-clonale de cellules tumorales progénitrices. Après confirmation de la présence d'un marquage vésiculaire par microscopie (données non montrées), nous avons transfecté les plasmides *hGH1-Nluc* et *Fluc* puis stimulé ces cellules par différents sécrétagogues communément utilisés dans la littérature (baryum, potassium, nicotine, PACAP, ionomycine). Toutefois, bien qu'une luminescence ait été mesurée au niveau intracellulaire, confirmant l'expression des rapporteurs, aucune activité de sécrétion n'a pu être détectée. Cette observation peut s'expliquer par le stade de développement précoce de la lignée hPheo1 entraînant une déficience dans la maturation de la voie de la sécrétion régulée.

Afin de confirmer nos résultats, cet outil pourrait également être appliqué à d'autres types cellulaires de TNE sécrétrices telles que les lignées humaines GOT1 et KRJ-I issues de l'iléum, la lignée humaine BON1 issue du pancréas ou encore la lignée humaine NCI-H727 dérivant d'une TNE pulmonaire (Evers et al., 1991; Kölby et al., 2001; Pfragner et al., 1996). Nous avons d'ores et déjà transposé ce système à la lignée humaine SH-SY5Y, l'une des plus utilisées en neurosciences, indifférenciée ou différenciée en cellule neuronale (Xicoy et al., 2017). Dérivant d'un neuroblastome humain, elle peut présenter un phénotype catécholaminergique pouvant synthétiser à la fois de la dopamine et de la noradrénaline la rendant très pertinente dans l'étude de la sécrétion régulée.

## 10. Lien entre l'hypersécrétion du PCC et son développement tumoral ?

Ces dernières décennies, les développements significatifs dans la compréhension de la fonction cellulaire chromaffine ont permis de forger une conception plus complexe et intégrative de la transduction du stress par la médullosurrénale. Outre l'acétylcholine, de nombreuses études ont mis en avant le *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide* (PACAP) comme neurotransmetteur dominant de la synapse splanchnico-médullosurrénale (Morales et al., 2023). Notamment, il a été montré que la libération d'acétylcholine est suppléée par le PACAP permettant d'assurer la neurotransmission sous des stimulations soutenues et répétitives du nerf splanchnique, déclenchées en réponse à des facteurs de stress (Guérineau, 2020). Très récemment, deux voies de signalisations distinctes permettant une sécrétion nuancée et variable des cellules chromaffines ont été décrites. En effet, il a été montré que le PACAP active une voie de signalisation impliquant la phospholipase C $\epsilon$  conduisant à une cinétique de libération des contenus vésiculaires plus lente qu'une exocytose causée par l'acétylcholine. Outre les catécholamines, la composition vésiculaire des cellules chromaffines de la médullosurrénale a été finement étudiée mettant en évidence la présence d'une grande variété de substances telles que des neurotransmetteurs, enzymes, protéines et peptides. Ce riche cocktail sécrétoire comprend, entre autres, les chromogranines et ses dérivés mais également d'autres peptides possédant un potentiel stimulant de la sécrétion tels que le NPY ou encore le PACAP. Sécrétés avec les catécholamines dans des conditions physiologiques, ils jouent un rôle important dans la réponse au stress et participent aux régulations homéostatiques. Il a été montré que le NPY, positivement régulé avec la sécrétion de catécholamines des cellules chromaffines humaines, exerce un fort effet vasoconstricteur sur les vaisseaux sanguins (Edvinsson et al., 1983). De plus, les effets du PACAP dans la sécrétion de catécholamines sont associés à une augmentation de l'expression de la TH, la DBH et la PNMT et de leur activité (Isobe et al., 2003). Une

attention particulière est portée sur le contenu peptidique et hormonal des vésicules de sécrétion du fait des effets endocrines, paracrines mais surtout autocrines qui leurs sont conférés. En effet, les cellules chromaffines sont elles-mêmes excitables et sensibles aux stimuli autocrines notamment par l'expression des récepteurs métabotropiques du NPY ou encore du PACAP (Carbone et al., 2019).

Une hypersécrétion de ces substances pourrait également résulter de la dérégulation de la sécrétion observée dans le PCC. À ce sujet, la présence de cellules productrices de NPY et des concentrations élevées de celui-ci ont été décrites dans les PCC humains (Thouënnon et al., 2010). Ces quantités importantes de NPY intra-tumorales peuvent s'expliquer par une forte expression de son gène, associée à une maturation efficace du précurseur. De plus, une activité angiogénique associée à l'activation autocrine de la prolifération cellulaire de ce peptide ont été décrites, lui conférant ainsi un rôle pro-tumoral (Kitlinska, 2007). Il serait ainsi pertinent d'évaluer l'effet pro-tumoral de nos miARN d'intérêt lors de la dérégulation de l'exocytose. Il en est de même pour le PACAP, également surexprimé dans le PPGL et dont les effets anti-apoptotiques et angiogéniques via la stimulation de l'expression du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) sont clairement démontrés (Ribatti et al., 2007).

Dès lors, bien qu'il soit légitime d'envisager un potentiel rôle pro-tumoral des catécholamines dans le PPGL, peu de données dans la littérature nous permettent d'apporter une réponse. Toutefois, il est établi que le stress, et plus particulièrement le stress chronique, est associé à une augmentation de l'incidence et du développement des cancers (Antoni et al., 2006; Reiche et al., 2004). En effet, les catécholamines, principales molécules impliquées dans cette réponse, sont sécrétées dans la tumeur et dans la circulation sous le contrôle du système nerveux sympathique pour maintenir le microenvironnement tumoral. Ainsi, selon les cellules cibles, ces neurotransmetteurs se lient à leurs récepteurs adrénergiques et peuvent activer plusieurs voies de signalisation qui favorisent la prolifération tumorale, l'angiogenèse ou encore la migration (X. Liu et al., 2008; Masur et al., 2001). Par exemple, il a été montré que ces hormones du stress, en se liant au récepteur  $\beta_2$  adrénergique, induisent l'activation de la protéine kinase A (PKA) favorisant le développement d'espèces réactives de l'oxygène entraînant des dommages à l'ADN et donc l'induction de cancer (Hara et al., 2011). D'autres voies ont également été décrites dans plusieurs tumeurs humaines dont notamment la modulation positive de l'expression du VEGF augmentant l'angiogenèse et la croissance tumorale (Moreno-Smith et al., 2010). Cette observation est d'autant plus intéressante qu'elle s'accompagne d'une augmentation de l'expression des récepteurs adrénergiques par les cellules



cancéreuses et notamment celles du pancréas, du poumon ou encore du sein (Draoui et al., 1991; Kondratenko et al., 1993; D. Zhang et al., 2011). De façon intéressante, il a également été montré que les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques étaient davantage exprimés dans des tumeurs de patients de haut grade comparé à la maladie de stade inférieur, suggérant leur implication dans la progression tumorale (Powe et al., 2011; Sardi et al., 2013). De plus, dans de nombreuses études, cette expression accrue de récepteurs était corrélée à une augmentation de la malignité. Dans le cancer de l'ovaire, il a été montré que ce phénotype métastatique résultait de l'activation de la kinase Src et de la signalisation associée (Armaiz-Pena et al., 2013). De façon intéressante, de nombreuses études épidémiologiques rapportent que l'administration d'alpha et de  $\beta$ -bloquants permettrait d'apporter une meilleure réponse thérapeutique améliorant la survie à long terme (Botteri et al., 2013; H. M. Wang et al., 2013). Ces résultats nécessitent toutefois d'être confirmés par des études supplémentaires. Ainsi, dans le PPGL, il serait intéressant d'évaluer l'impact de l'hypersécrétion de catécholamines sur le développement tumoral.

## Conclusion

Les études présentées dans le cadre de ma thèse ont pour objectif d'identifier les causes de l'hypersécrétion de catécholamines caractéristique du PCC, une tumeur neuroendocrine rare, et d'acquérir une vision globale de l'implication des miARN dans ce processus.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'hypersécrétion de catécholamines observée dans le PCC n'est pas seulement due à un effet de masse tumorale mais qu'elle est également consécutive d'une dérégulation du mécanisme d'exocytose de ces cellules. Dans cette optique, la sécrétion de catécholamines a été évaluée en réalisant des enregistrements par ampérométrie à fibre de carbone de l'activité d'exocytose de cellules tumorales individuelles cultivées directement à partir de PCC humains fraîchement rééqués. Ces observations ont été renforcées par une analyse protéomique de l'expression des protéines impliquées dans ce processus ainsi qu'une exploitation de données transcriptomiques. Ainsi, l'hypersécrétion de catécholamines observée dans le PCC résulte d'une augmentation des événements d'exocytose associée à une surexpression générale des gènes de l'exocytose, tant au niveau transcriptionnel que protéique. Une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la composition des GSCD et la biosynthèse de catécholamines a également été mise en évidence.

Dans un second temps, nous avons cherché à identifier les potentiels régulateurs de cette hypersécrétion hormonale en étudiant la piste des miARN, des acteurs essentiels de l'homéostasie cellulaire. Sur la base d'approches bio-informatiques et fonctionnelles, nous avons mis en évidence 20 miARN inhibiteurs de la sécrétion ciblant les gènes essentiels au processus d'exocytose. Finalement, nous avons approfondi le rôle fonctionnel joué par miR-34a-5p en confirmant son effet inhibiteur sur l'activité de sécrétion de cellules chromaffines par une approche d'ampérométrie à fibre de carbone.

*In fine*, ces études constituent la première mise en évidence d'un dysfonctionnement, à l'échelle de la cellule unique, du processus d'exocytose à l'origine de l'hypersécrétion de catécholamines observée dans le PCC humain. Nous avons également montré le rôle majeur joué par un groupe de 20 miARN régulateurs post-transcriptionnels de l'expression des gènes de l'exocytose. Leur sous-expression globale dans le PCC est associée à la surexpression des gènes de l'exocytose et ainsi à la suractivation de la sécrétion de catécholamines. Ces études constituent un point de départ solide vers une meilleure compréhension de la physiopathologie des PCC et plus généralement des TNE, principalement caractérisées par une hypersécrétion hormonale. Le processus d'exocytose étant commun aux cellules sécrétrices telles que les neurones et les

cellules  $\beta$ -pancréatiques, les résultats de cette étude représentent également une avancée notable dans la compréhension des pathologies de la sécrétion telles que les insulinomes ou les SNAROPathies (Verhage & Sørensen, 2020). En conclusion, cette étude apporte une confirmation solide de l'implication significative des miARN dans le maintien de l'homéostasie, consolidant ainsi notre appréciation de leur impact fondamental sur la régulation des processus biologiques.

## Références bibliographiques

- Abdelaal, A. M., Sohal, I. S., Iyer, S., Sudarshan, K., Kothandaraman, H., Lanman, N. A., Low, P. S., & Kasinski, A. L. (2023). A first-in-class fully modified version of miR-34a with outstanding stability, activity, and anti-tumor efficacy. *Oncogene*, *42*(40), 2985–2999. <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02801-8>
- Adams, L. (2017). Pri-miRNA processing: Structure is key. *Nature Reviews Genetics*, *18*(3), 145–145. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.6>
- Adams, M. S., & Bronner-Fraser, M. (2009). Review: The Role of Neural Crest Cells in the Endocrine System. *Endocrine Pathology*, *20*(2), 92–100. <https://doi.org/10.1007/s12022-009-9070-6>
- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J.-W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, *4*, e05005. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- Ahlquist, R. P. (1948). A STUDY OF THE ADRENOTROPIC RECEPTORS. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *153*(3), 586–600. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1948.153.3.586>
- Ahras, M., Otto, G. P., & Tooze, S. A. (2006). Synaptotagmin IV is necessary for the maturation of secretory granules in PC12 cells. *The Journal of Cell Biology*, *173*(2), 241–251. <https://doi.org/10.1083/jcb.200506163>
- Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., De Toledo, G. A., & Lindau, M. (1997). The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature*, *389*(6650), 509–512. <https://doi.org/10.1038/39081>
- Alezais, H., & Peyron, A. (1908). Un groupe nouveau de tumeurs epitheliales: Les paraganglions. *Compte Rend Soc Biol (Paris)*, *65*, 745–747.
- Almers, W. (1990). Exocytosis. *Annual Review of Physiology*, *52*(1), 607–624. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.52.030190.003135>
- Alrezk, R., Suarez, A., Tena, I., & Pacak, K. (2018). Update of Pheochromocytoma Syndromes: Genetics, Biochemical Evaluation, and Imaging. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 515. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00515>
- Álvarez, Y. D., Ibañez, L. I., Uchitel, O. D., & Marengo, F. D. (2008). P/Q Ca<sup>2+</sup> channels are

functionally coupled to exocytosis of the immediately releasable pool in mouse chromaffin cells. *Cell Calcium*, 43(2), 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.04.014>

Ambros, V. (2008). The evolution of our thinking about microRNAs. *Nature Medicine*, 14(10), 1036–1040. <https://doi.org/10.1038/nm1008-1036>

Ameyar-Zazoua, M., Rachez, C., Souidi, M., Robin, P., Fritsch, L., Young, R., Morozova, N., Fenouil, R., Descostes, N., Andrau, J.-C., Mathieu, J., Hamiche, A., Ait-Si-Ali, S., Muchardt, C., Batsché, E., & Harel-Bellan, A. (2012). Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(10), 998–1004. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2373>

Andrew, A., & Kramer, B. (1979). An experimental investigation into the possible origin of pancreatic islet cells from rhombencephalic neurectoderm. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 52, 23–38.

Antoni, M. H., Lutgendorf, S. K., Cole, S. W., Dhabhar, F. S., Sephton, S. E., McDonald, P. G., Stefanek, M., & Sood, A. K. (2006). The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: Pathways and mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 6(3), 240–248. <https://doi.org/10.1038/nrc1820>

Armaiz-Pena, G. N., Allen, J. K., Cruz, A., Stone, R. L., Nick, A. M., Lin, Y. G., Han, L. Y., Mangala, L. S., Villares, G. J., Vivas-Mejia, P., Rodriguez-Aguayo, C., Nagaraja, A. S., Gharpure, K. M., Wu, Z., English, R. D., Soman, K. V., Shahzad, M. M. K., Zigler, M., Deavers, M. T., ... Sood, A. K. (2013). Src activation by  $\beta$ -adrenoreceptors is a key switch for tumour metastasis. *Nature Communications*, 4(1), 1403. <https://doi.org/10.1038/ncomms2413>

Arvan, P., & Castle, D. (1998). Sorting and storage during secretory granule biogenesis: Looking backward and looking forward. *Biochemical Journal*, 332(3), 593–610. <https://doi.org/10.1042/bj3320593>

Asp, L., Kartberg, F., Fernandez-Rodriguez, J., Smedh, M., Elsner, M., Laporte, F., Bárcena, M., Jansen, K. A., Valentijn, J. A., Koster, A. J., Bergeron, J. J. M., & Nilsson, T. (2009). Early Stages of Golgi Vesicle and Tubule Formation Require Diacylglycerol. *Molecular Biology of the Cell*, 20(3), 780–790. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-03-0256>

Aunis, D. (1998). Exocytosis in Chromaffin Cells of the Adrenal Medulla. In *International Review of Cytology* (Vol. 181, pp. 213–320). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60419-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60419-2)

- Auyeung, V. C., Ulitsky, I., McGeary, S. E., & Bartel, D. P. (2013). Beyond Secondary Structure: Primary-Sequence Determinants License Pri-miRNA Hairpins for Processing. *Cell*, *152*(4), 844–858. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.031>
- Ayala-Ramirez, M., Feng, L., Johnson, M. M., Ejaz, S., Habra, M. A., Rich, T., Busaidy, N., Cote, G. J., Perrier, N., Phan, A., Patel, S., Waguespack, S., & Jimenez, C. (2011). Clinical Risk Factors for Malignancy and Overall Survival in Patients with Pheochromocytomas and Sympathetic Paragangliomas: Primary Tumor Size and Primary Tumor Location as Prognostic Indicators. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *96*(3), 717–725. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1946>
- Babiarz, J. E., Ruby, J. G., Wang, Y., Bartel, D. P., & Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes & Development*, *22*(20), 2773–2785. <https://doi.org/10.1101/gad.1705308>
- Bacaj, T., Wu, D., Yang, X., Morishita, W., Zhou, P., Xu, W., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2013). Synaptotagmin-1 and synaptotagmin-7 trigger synchronous and asynchronous phases of neurotransmitter release. *Neuron*, *80*(4), 947–959. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.026>
- Backman, S., Maharjan, R., Falk-Delgado, A., Crona, J., Cupisti, K., Stålberg, P., Hellman, P., & Björklund, P. (2017). Global DNA Methylation Analysis Identifies Two Discrete clusters of Pheochromocytoma with Distinct Genomic and Genetic Alterations. *Scientific Reports*, *7*, 44943. <https://doi.org/10.1038/srep44943>
- Badenhop, R. F., Cherian, S., Lord, R. S. A., Baysal, B. E., Taschner, P. E. M., & Schofield, P. R. (2001). Novel mutations in the SDHD gene in pedigrees with familial carotid body paraganglioma and sensorineural hearing loss. *Genes, Chromosomes and Cancer*, *31*(3), 255–263. <https://doi.org/10.1002/gcc.1142>
- Bader, A. G. (2012). miR-34 – a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Frontiers in Genetics*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00120>
- Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P., & Bartel, D. P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, *455*(7209), 64–71. <https://doi.org/10.1038/nature07242>
- Bagge, A., Dahmcke, C., & Dalgaard, L. (2013). Syntaxin-1a is a Direct Target of miR-29a in

Insulin-producing  $\beta$ -Cells. *Hormone and Metabolic Research*, 45(06), 463–466. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1333238>

Bandyopadhyay, S., Ghosh, D., Mitra, R., & Zhao, Z. (2015). MBSTAR: Multiple instance learning for predicting specific functional binding sites in microRNA targets. *Scientific Reports*, 5(1), 8004. <https://doi.org/10.1038/srep08004>

Banerjee, A., Barry, V. A., DasGupta, B. R., & Martin, T. F. J. (1996). N-Ethylmaleimide-sensitive Factor Acts at a Prefusion ATP-dependent Step in  $Ca^{2+}$ -activated Exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 271(34), 20223–20226. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20223>

Barollo, S., Bertazza, L., Watutantrige-Fernando, S., Censi, S., Cavedon, E., Galuppini, F., Pennelli, G., Fassina, A., Citton, M., Rubin, B., Pezzani, R., Benna, C., Opocher, G., Iacobone, M., & Mian, C. (2016). Overexpression of L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1) and 2 (LAT2): Novel Markers of Neuroendocrine Tumors. *PLOS ONE*, 11(5), e0156044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156044>

Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1), 20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>

Baskerville, S., & Bartel, D. P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*, 11(3), 241–247. <https://doi.org/10.1261/rna.7240905>

Basuroy, R., Bouvier, C., Ramage, J. K., Sissons, M., & Srirajaskanthan, R. (2018). Delays and routes to diagnosis of neuroendocrine tumours. *BMC Cancer*, 18(1), 1122. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-5057-3>

Baudin, E., Habra, M. A., Deschamps, F., Cote, G., Dumont, F., Cabanillas, M., Arfi-Roufe, J., Berdelou, A., Moon, B., Al Ghuzlan, A., Patel, S., Leboulleux, S., & Jimenez, C. (2014). THERAPY OF ENDOCRINE DISEASE: Treatment of malignant pheochromocytoma and paraganglioma. *European Journal of Endocrinology*, 171(3), R111–R122. <https://doi.org/10.1530/EJE-14-0113>

Baugh, E. H., Ke, H., Levine, A. J., Bonneau, R. A., & Chan, C. S. (2018). Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? *Cell Death & Differentiation*, 25(1), 154–160. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.180>

Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., & Izaurralde, E. (2006).

mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & Development*, 20(14), 1885–1898. <https://doi.org/10.1101/gad.1424106>

Bellaousov, S., Reuter, J. S., Seetin, M. G., & Mathews, D. H. (2013). RNAstructure: Web servers for RNA secondary structure prediction and analysis. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), W471–W474. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt290>

Berezikov, E., Chung, W.-J., Willis, J., Cuppen, E., & Lai, E. C. (2007). Mammalian Mirtron Genes. *Molecular Cell*, 28(2), 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.028>

Berger, I., Werdermann, M., Bornstein, S. R., & Steenblock, C. (2019). The adrenal gland in stress – Adaptation on a cellular level. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 190, 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.04.006>

Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A., Elledge, S. J., Anderson, K. V., & Hannon, G. J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nature Genetics*, 35(3), 215–217. <https://doi.org/10.1038/ng1253>

Bessell-Browne, R., & O'Malley, M. E. (2007). CT of Pheochromocytoma and Paraganglioma: Risk of Adverse Events with IV Administration of Nonionic Contrast Material. *American Journal of Roentgenology*, 188(4), 970–974. <https://doi.org/10.2214/AJR.06.0827>

Betz, A., Thakur, P., Junge, H. J., Ashery, U., Rhee, J.-S., Scheuss, V., Rosenmund, C., Rettig, J., & Brose, N. (2001). Functional Interaction of the Active Zone Proteins Munc13-1 and RIM1 in Synaptic Vesicle Priming. *Neuron*, 30(1), 183–196. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00272-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00272-0)

Bhalla, A., Tucker, W. C., & Chapman, E. R. (2005). Synaptotagmin Isoforms Couple Distinct Ranges of Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, and Sr<sup>2+</sup> Concentration to SNARE-mediated Membrane Fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 16(10), 4755–4764. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-04-0277>

Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I., & Filipowicz, W. (2006). Relief of microRNA-Mediated Translational Repression in Human Cells Subjected to Stress. *Cell*, 125(6), 1111–1124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.031>

Birinci, Y., Preobraschenski, J., Ganzella, M., Jahn, R., & Park, Y. (2020). Isolation of large dense-core vesicles from bovine adrenal medulla for functional studies. *Scientific Reports*, 10(1), 7540. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64486-3>



- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., & Görlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, *10*(2), 185–191. <https://doi.org/10.1261/rna.5167604>
- Boncompain, G., Divoux, S., Gareil, N., De Forges, H., Lescure, A., Latreche, L., Mercanti, V., Jollivet, F., Raposo, G., & Perez, F. (2012). Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nature Methods*, *9*(5), 493–498. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1928>
- Boncompain, G., Fourriere, L., Gareil, N., & Perez, F. (2021). Retention Using Selective Hooks-Synchronized Secretion to Measure Local Exocytosis. In F. Niedergang, N. Vitale, & S. Gasman (Eds.), *Exocytosis and Endocytosis* (Vol. 2233, pp. 253–264). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1044-2\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1044-2_17)
- Borchert, G. M., Lanier, W., & Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology*, *13*(12), 1097–1101. <https://doi.org/10.1038/nsmb1167>
- Bornstein, S. R., Gonzalez-Hernandez, J. A., Ehrhart-Bornstein, M., Adler, G., & Scherbaum, W. A. (1994). Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *78*(1), 225–232. <https://doi.org/10.1210/jcem.78.1.7507122>
- Botteri, E., Munzone, E., Rotmensz, N., Cipolla, C., De Giorgi, V., Santillo, B., Zanelotti, A., Adamoli, L., Colleoni, M., Viale, G., Goldhirsch, A., & Gandini, S. (2013). Therapeutic effect of  $\beta$ -blockers in triple-negative breast cancer postmenopausal women. *Breast Cancer Research and Treatment*, *140*(3), 567–575. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2654-3>
- Bottini, S., Hamouda-Tekaya, N., Mategot, R., Zaragosi, L.-E., Audebert, S., Pisano, S., Grandjean, V., Mauduit, C., Benahmed, M., Barbry, P., Repetto, E., & Trabucchi, M. (2017). Post-transcriptional gene silencing mediated by microRNAs is controlled by nucleoplasmic Sfpq. *Nature Communications*, *8*(1), 1189. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01126-x>
- Brandt, B. L., Hagiwara, S., Kidokoro, Y., & Miyazaki, S. (1976). Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *The Journal of Physiology*, *263*(3), 417–439. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1976.sp011638>
- Bråte, J., Neumann, R. S., Fromm, B., Haraldsen, A. A. B., Tarver, J. E., Suga, H., Donoghue, P. C. J., Peterson, K. J., Ruiz-Trillo, I., Grini, P. E., & Shalchian-Tabrizi, K. (2018). Unicellular Origin of the Animal MicroRNA Machinery. *Current Biology*, *28*(20), 3288–3295.e5.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.08.018>

Braun, J. E., Huntzinger, E., Fauser, M., & Izaurralde, E. (2011). GW182 Proteins Directly Recruit Cytoplasmic Deadenylation Complexes to miRNA Targets. *Molecular Cell*, *44*(1), 120–133. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.09.007>

Braun, J. E., Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2012). A Molecular Link between miRISCs and Deadenylation Provides New Insight into the Mechanism of Gene Silencing by MicroRNAs. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(12), a012328–a012328. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012328>

Buitenwerf, E., Osinga, T. E., Timmers, H. J. L. M., Lenders, J. W. M., Feelders, R. A., Eekhoff, E. M. W., Haak, H. R., Corssmit, E. P. M., Bisschop, P. H. L. T., Valk, G. D., Veldman, R. G., Dullaart, R. P. F., Links, T. P., Voogd, M. F., Wietasch, G. J. K. G., & Kerstens, M. N. (2020). Efficacy of  $\alpha$ -Blockers on Hemodynamic Control during Pheochromocytoma Resection: A Randomized Controlled Trial. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *105*(7), 2381–2391. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz188>

Burnichon, N., Vescovo, L., Amar, L., Libé, R., De Reynies, A., Venisse, A., Jouanno, E., Laurendeau, I., Parfait, B., Bertherat, J., Plouin, P.-F., Jeunemaitre, X., Favier, J., & Gimenez-Roqueplo, A.-P. (2011). Integrative genomic analysis reveals somatic mutations in pheochromocytoma and paraganglioma. *Human Molecular Genetics*, *20*(20), 3974–3985. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr324>

Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M. R., & Südhof, T. C. (2010).  $\alpha$ -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro. *Science*, *329*(5999), 1663–1667. <https://doi.org/10.1126/science.1195227>

Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA-Cancer Connection: The Beginning of a New Tale. *Cancer Research*, *66*(15), 7390–7394. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0800>

Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., & Croce, C. M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(9), 2999–3004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307323101>

Calsina, B., Castro-Vega, L. J., Torres-Pérez, R., Inglada-Pérez, L., Currás-Freixes, M., Roldán-Romero, J. M., Mancikova, V., Letón, R., Remacha, L., Santos, M., Burnichon, N., Lussey-Lepoutre, C., Rapizzi, E., Graña, O., Álvarez-Escolá, C., De Cubas, A. A., Lanillos, J.,

- Cordero-Barreal, A., Martínez-Montes, Á. M., ... Robledo, M. (2019). Integrative multi-omics analysis identifies a prognostic miRNA signature and a targetable miR-21-3p/TSC2/mTOR axis in metastatic pheochromocytoma/paraganglioma. *Theranostics*, 9(17), 4946–4958. <https://doi.org/10.7150/thno.35458>
- Campos-Melo, D., Droppelmann, C., Volkening, K., & Strong, M. (2014). Comprehensive Luciferase-Based Reporter Gene Assay Reveals Previously Masked Up-Regulatory Effects of miRNAs. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 15592–15602. <https://doi.org/10.3390/ijms150915592>
- Cannon, W. B. (1915). *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage: An account of recent researches into the function of emotional excitement*. D Appleton & Company. <https://doi.org/10.1037/10013-000>
- Cannon, W. B. (1929). ORGANIZATION FOR PHYSIOLOGICAL HOMEOSTASIS. *Physiological Reviews*, 9(3), 399–431. <https://doi.org/10.1152/physrev.1929.9.3.399>
- Cannon, W. B., & de la Paz, D. (1911). EMOTIONAL STIMULATION OF ADRENAL SECRETION. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 28(1), 64–70. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1911.28.1.64>
- Carballeira, A., & Fishman, L. M. (1980). The Adrenal Functional Unit: A Hypothesis. *Perspectives in Biology and Medicine*, 23(4), 573–597. <https://doi.org/10.1353/pbm.1980.0064>
- Carbone, E., Borges, R., Eiden, L. E., García, A. G., & Hernández-Cruz, A. (2019). Chromaffin Cells of the Adrenal Medulla: Physiology, Pharmacology, and Disease. In R. Terjung (Ed.), *Comprehensive Physiology* (1st ed., pp. 1443–1502). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c190003>
- Carmon, O., Laguerre, F., Riachy, L., Delestre-Delacour, C., Wang, Q., Tanguy, E., Jeandel, L., Cartier, D., Thahouly, T., Haeberlé, A., Fouillen, L., Rezazgui, O., Schapman, D., Haefelé, A., Goumon, Y., Galas, L., Renard, P., Alexandre, S., Vitale, N., ... Montero-Hadjadje, M. (2020). Chromogranin A preferential interaction with Golgi phosphatidic acid induces membrane deformation and contributes to secretory granule biogenesis. *The FASEB Journal*, 34(5), 6769–6790. <https://doi.org/10.1096/fj.202000074R>
- Castanotto, D., Lingeman, R., Riggs, A. D., & Rossi, J. J. (2009). CRM1 mediates nuclear-cytoplasmic shuttling of mature microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51), 21655–21659. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912384106>

- Castro-Vega, L. J., Letouzé, E., Burnichon, N., Buffet, A., Disderot, P.-H., Khalifa, E., Lorient, C., Elarouci, N., Morin, A., Menara, M., Lepoutre-Lussey, C., Badoual, C., Sibony, M., Dousset, B., Libé, R., Zinzindohoue, F., Plouin, P. F., Bertherat, J., Amar, L., ... Gimenez-Roqueplo, A.-P. (2015). Multi-omics analysis defines core genomic alterations in pheochromocytomas and paragangliomas. *Nature Communications*, 6(1), 6044. <https://doi.org/10.1038/ncomms7044>
- Ceccatelli, S., Dagerlind, Å., Schalling, M., Wikström, A.-C., Okret, S., Gustafsson, J. A., Goldstein, M., & Hökfelt, T. (1989). The glucocorticoid receptor in the adrenal gland is localized in the cytoplasm of adrenaline cells. *Acta Physiologica Scandinavica*, 137(4), 559–560. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1989.tb08800.x>
- Chakravarthy, S., Sternberg, S. H., Kellenberger, C. A., & Doudna, J. A. (2010). Substrate-Specific Kinetics of Dicer-Catalyzed RNA Processing. *Journal of Molecular Biology*, 404(3), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.09.030>
- Chanaday, N. L., Cousin, M. A., Milosevic, I., Watanabe, S., & Morgan, J. R. (2019). The Synaptic Vesicle Cycle Revisited: New Insights into the Modes and Mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, 39(42), 8209–8216. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1158-19.2019>
- Chanat, E., & Huttner, W. B. (1991). Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. *Journal of Cell Biology*, 115(6), 1505–1519. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.6.1505>
- Chen, B., Zhang, B., Luo, H., Yuan, J., Skogerbø, G., & Chen, R. (2012). Distinct MicroRNA Subcellular Size and Expression Patterns in Human Cancer Cells. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2012/672462>
- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., & Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051), 740–744. <https://doi.org/10.1038/nature03868>
- Cheung, G., Jupp, O. J., & Cousin, M. A. (2010). Activity-Dependent Bulk Endocytosis and Clathrin-Dependent Endocytosis Replenish Specific Synaptic Vesicle Pools in Central Nerve Terminals. *Journal of Neuroscience*, 30(24), 8151–8161. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0293-10.2010>
- Chiosea, S., Jelezcova, E., Chandran, U., Acquafondata, M., McHale, T., Sobol, R. W., & Dhir, R. (2006). Up-Regulation of Dicer, a Component of the MicroRNA Machinery, in Prostate

Adenocarcinoma. *The American Journal of Pathology*, 169(5), 1812–1820. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060480>

Cho, Y. Y., Kwak, M. K., Lee, S.-E., Ahn, S. H., Kim, H., Suh, S., Kim, B.-J., Song, K.-H., Koh, J.-M., Kim, J. H., & Lee, S. H. (2018). A clinical prediction model to estimate the metastatic potential of pheochromocytoma/paraganglioma: ASES score. *Surgery*, 164(3), 511–517. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2018.05.001>

Chong, M. M. W., Zhang, G., Cheloufi, S., Neubert, T. A., Hannon, G. J., & Littman, D. R. (2010). Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery. *Genes & Development*, 24(17), 1951–1960. <https://doi.org/10.1101/gad.1953310>

Cohen, J. E., Lee, P. R., Chen, S., Li, W., & Fields, R. D. (2011). MicroRNA regulation of homeostatic synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), 11650–11655. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017576108>

Colomer, C., Desarménien, M. G., & Guérineau, N. C. (2009). Revisiting the Stimulus-Secretion Coupling in the Adrenal Medulla: Role of Gap Junction-Mediated Intercellular Communication. *Molecular Neurobiology*, 40(1), 87–100. <https://doi.org/10.1007/s12035-009-8073-0>

Connerty, P., Ahadi, A., & Hutvagner, G. (2015). RNA Binding Proteins in the miRNA Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), 31. <https://doi.org/10.3390/ijms17010031>

Coppola, T., Frantz, C., Perret-Menoud, V., Gattesco, S., Hirling, H., & Regazzi, R. (2002). Pancreatic  $\beta$ -Cell Protein Granophilin Binds Rab3 and Munc-18 and Controls Exocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 13(6), 1906–1915. <https://doi.org/10.1091/mbc.02-02-0025>

Cornu, E., Belmihoub, I., Burnichon, N., Grataloup, C., Zinzindohoué, F., Baron, S., Billaud, E., Azizi, M., Gimenez-Roqueplo, A.-P., & Amar, L. (2019). Phéochromocytome et paragangliome. *La Revue de Médecine Interne*, 40(11), 733–741. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2019.07.008>

Crivellato, E., Nico, B., & Ribatti, D. (2008). The Chromaffin Vesicle: Advances in Understanding the Composition of a Versatile, Multifunctional Secretory Organelle. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 291(12), 1587–1602. <https://doi.org/10.1002/ar.20763>

- Crona, J., Lamarca, A., Ghosal, S., Welin, S., Skogseid, B., & Pacak, K. (2019). Genotype–phenotype correlations in pheochromocytoma and paraganglioma: A systematic review and individual patient meta-analysis. *Endocrine-Related Cancer*, 26(5), 539–550. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0024>
- Crout, J. R., & Sjoerdsma, A. (1964). Turnover and Metabolism of Catecholamines in Patients with Pheochromocytoma\*. *Journal of Clinical Investigation*, 43(1), 94–102. <https://doi.org/10.1172/JCI104898>
- Dahia, P. L. M. (2014). Pheochromocytoma and paraganglioma pathogenesis: Learning from genetic heterogeneity. *Nature Reviews Cancer*, 14(2), 108–119. <https://doi.org/10.1038/nrc3648>
- D’Alessandro, R., Klajn, A., & Meldolesi, J. (2009). Expression of Dense-core Vesicles and of Their Exocytosis Are Governed by the Repressive Transcription Factor NRSF/REST. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1152(1), 194–200. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03988.x>
- Dalmay, T., & Edwards, D. R. (2006). MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene*, 25(46), 6170–6175. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209911>
- Daubner, S. C., Le, T., & Wang, S. (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 508(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.017>
- De Cubas, A. A., Leandro-García, L. J., Schiavi, F., Mancikova, V., Comino-Méndez, I., Inglada-Pérez, L., Perez-Martinez, M., Ibarz, N., Ximénez-Embún, P., López-Jiménez, E., Maliszewska, A., Letón, R., Gómez Graña, Á., Bernal, C., Álvarez-Escolá, C., Rodríguez-Antona, C., Opocher, G., Muñoz, J., Megias, D., ... Robledo, M. (2013). Integrative analysis of miRNA and mRNA expression profiles in pheochromocytoma and paraganglioma identifies genotype-specific markers and potentially regulated pathways. *Endocrine-Related Cancer*, 20(4), 477–493. <https://doi.org/10.1530/ERC-12-0183>
- Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), 231–235. <https://doi.org/10.1038/nature03049>
- Denorme, M., Yon, L., Roux, C., Gonzalez, B. J., Baudin, E., Anouar, Y., & Dubessy, C. (2014). Both sunitinib and sorafenib are effective treatments for pheochromocytoma in a

xenograft model. *Cancer Letters*, 352(2), 236–244.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.07.005>

Dermitzaki, E., Gravanis, A., Venihaki, M., Stournaras, C., & Margioris, A. N. (2001). Opioids Suppress Basal and Nicotine-Induced Catecholamine Secretion Via a Stabilizing Effect on Actin Filaments\*. *Endocrinology*, 142(5), 2022–2031.  
<https://doi.org/10.1210/endo.142.5.8133>

Dhara, M., Mohrmann, R., & Bruns, D. (2018). V-SNARE function in chromaffin cells. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 470(1), 169–180.  
<https://doi.org/10.1007/s00424-017-2066-z>

Dombi, E., Baldwin, A., Marcus, L. J., Fisher, M. J., Weiss, B., Kim, A., Whitcomb, P., Martin, S., Aschbacher-Smith, L. E., Rizvi, T. A., Wu, J., Ershler, R., Wolters, P., Therrien, J., Glod, J., Belasco, J. B., Schorry, E., Brofferio, A., Starosta, A. J., ... Widemann, B. C. (2016). Activity of Selumetinib in Neurofibromatosis Type 1–Related Plexiform Neurofibromas. *New England Journal of Medicine*, 375(26), 2550–2560. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1605943>

Dostie, J. (2000). A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *The EMBO Journal*, 19(12), 3142–3156.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/19.12.3142>

Draoui, A., Vandewalle, B., Hornez, L., Revillion, F., & Lefebvre, J. (1991). Beta-adrenergic receptors in human breast cancer: Identification, characterization and correlation with progesterone and estradiol receptors. *Anticancer Research*, 11(2), 677–680.

Dulubova, I. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: Role of munc18. *The EMBO Journal*, 18(16), 4372–4382. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.16.4372>

Dulubova, I., Lou, X., Lu, J., Huryeva, I., Alam, A., Schneggenburger, R., Südhof, T. C., & Rizo, J. (2005). A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: From priming to plasticity? *The EMBO Journal*, 24(16), 2839–2850. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600753>

Duursma, A. M., Kedde, M., Schrier, M., Le Sage, C., & Agami, R. (2008). miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA*, 14(5), 872–877.  
<https://doi.org/10.1261/rna.972008>

Ebbehoj, A., Stochholm, K., Jacobsen, S. F., Trolle, C., Jepsen, P., Robaczyk, M. G., Rasmussen, Å. K., Feldt-Rasmussen, U., Thomsen, R. W., Søndergaard, E., & Poulsen, P. L.

- (2021). Incidence and Clinical Presentation of Pheochromocytoma and Sympathetic Paraganglioma: A Population-based Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *106*(5), e2251–e2261. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa965>
- Ecsedi, M., Rausch, M., & Großhans, H. (2015). The let-7 microRNA Directs Vulval Development through a Single Target. *Developmental Cell*, *32*(3), 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.12.018>
- Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A., & Jaenisch, R. (2003). Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation. *Science*, *300*(5618), 455–455. <https://doi.org/10.1126/science.1083557>
- Edvinsson, L., Emson, P., McCulloch, J., Tatemoto, K., & Uddman, R. (1983). Neuropeptide Y: Cerebrovascular innervation and vasomotor effects in the cat. *Neuroscience Letters*, *43*(1), 79–84. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(83\)90132-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(83)90132-5)
- Ehrhart-Bornstein, M., & Bornstein, S. R. (2008). Cross-talk between Adrenal Medulla and Adrenal Cortex in Stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1148*(1), 112–117. <https://doi.org/10.1196/annals.1410.053>
- Ehrhart-Bornstein, M., Hinson, J. P., Bornstein, S. R., Scherbaum, W. A., & Vinson, G. P. (1998). Intraadrenal Interactions in the Regulation of Adrenocortical Steroidogenesis. *Endocrine Reviews*, *19*(2), 101–143. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.2.0326>
- Eichhorn, S. W., Guo, H., McGeary, S. E., Rodriguez-Mias, R. A., Shin, C., Baek, D., Hsu, S., Ghoshal, K., Villén, J., & Bartel, D. P. (2014). mRNA Destabilization Is the Dominant Effect of Mammalian MicroRNAs by the Time Substantial Repression Ensues. *Molecular Cell*, *56*(1), 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.028>
- Eisenhofer, G., Huynh, T. T., Hiroi, M., & Pacak, K. (2001). Understanding catecholamine metabolism as a guide to the biochemical diagnosis of pheochromocytoma. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, *2*(3), 297–311. <https://doi.org/10.1023/a:1011572617314>
- Eisenhofer, G., Huynh, T.-T., Elkahloun, A., Morris, J. C., Bratslavsky, G., Linehan, W. M., Zhuang, Z., Balgley, B. M., Lee, C. S., Mannelli, M., Lenders, J. W. M., Bornstein, S. R., & Pacak, K. (2008). Differential expression of the regulated catecholamine secretory pathway in different hereditary forms of pheochromocytoma. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *295*(5), E1223–E1233. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90591.2008>



Eisenhofer, G., Klink, B., Richter, S., Lenders, J. W., & Robledo, M. (2017). Metabologenomics of Pheochromocytoma and Paraganglioma: An Integrated Approach for Personalised Biochemical and Genetic Testing. *The Clinical Biochemist. Reviews*, *38*(2), 69–100.

Eisenhofer, G., Lenders, J. W. M., Siegert, G., Bornstein, S. R., Friberg, P., Milosevic, D., Mannelli, M., Linehan, W. M., Adams, K., Timmers, H. J., & Pacak, K. (2012). Plasma methoxytyramine: A novel biomarker of metastatic pheochromocytoma and paraganglioma in relation to established risk factors of tumour size, location and SDHB mutation status. *European Journal of Cancer*, *48*(11), 1739–1749. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.07.016>

Eisenhofer, G., Lenders, J. W., Timmers, H., Mannelli, M., Grebe, S. K., Hofbauer, L. C., Bornstein, S. R., Tiebel, O., Adams, K., Bratslavsky, G., Linehan, W. M., & Pacak, K. (2011). Measurements of Plasma Methoxytyramine, Normetanephrine, and Metanephrine as Discriminators of Different Hereditary Forms of Pheochromocytoma. *Clinical Chemistry*, *57*(3), 411–420. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.153320>

Eisenhofer, G., Pacak, K., Huynh, T.-T., Qin, N., Bratslavsky, G., Linehan, W. M., Mannelli, M., Friberg, P., Grebe, S. K., Timmers, H. J., Bornstein, S. R., & Lenders, J. W. M. (2010). Catecholamine metabolomic and secretory phenotypes in pheochromocytoma. *Endocrine Related Cancer*, *18*(1), 97–111. <https://doi.org/10.1677/ERC-10-0211>

Eisenhofer, G., Prejbisz, A., Peitzsch, M., Pamporaki, C., Masjkur, J., Rogowski-Lehmann, N., Langton, K., Tsourdi, E., Pęczkowska, M., Fliedner, S., Deutschbein, T., Megerle, F., Timmers, H. J. L. M., Sinnott, R., Beuschlein, F., Fassnacht, M., Januszewicz, A., & Lenders, J. W. M. (2018). Biochemical Diagnosis of Chromaffin Cell Tumors in Patients at High and Low Risk of Disease: Plasma versus Urinary Free or Deconjugated O-Methylated Catecholamine Metabolites. *Clinical Chemistry*, *64*(11), 1646–1656. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.291369>

Eisenhofer, G., Rivers, G., Rosas, A. L., Quezado, Z., Manger, W. M., & Pacak, K. (2007). Adverse Drug Reactions in Patients with Pheochromocytoma: Incidence, Prevention and Management. *Drug Safety*, *30*(11), 1031–1062. <https://doi.org/10.2165/00002018-200730110-00004>

Eisenhofer, G., Rundquist, B., Aneman, A., Friberg, P., Dakak, N., Kopin, I. J., Jacobs, M. C., & Lenders, J. W. (1995). Regional release and removal of catecholamines and extraneuronal

metabolism to metanephrines. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 80(10), 3009–3017. <https://doi.org/10.1210/jcem.80.10.7559889>

Ekici, M., Hohl, M., Schuit, F., Martínez-Serrano, A., & Thiel, G. (2008). Transcription of Genes Encoding Synaptic Vesicle Proteins in Human Neural Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9257–9268. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709388200>

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836), 494–498. <https://doi.org/10.1038/35078107>

Ender, C., Krek, A., Friedländer, M. R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N., & Meister, G. (2008). A Human snoRNA with MicroRNA-Like Functions. *Molecular Cell*, 32(4), 519–528. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.017>

Eriksson, B., Öberg, K., & Stridsberg, M. (2000). Tumor Markers in Neuroendocrine Tumors. *Digestion*, 62(Suppl. 1), 33–38. <https://doi.org/10.1159/000051853>

Eulalio, A., Triteschler, F., & Izaurralde, E. (2009). The GW182 protein family in animal cells: New insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA*, 15(8), 1433–1442. <https://doi.org/10.1261/rna.1703809>

Evers, B. M., Townsend, C. M., Upp, J. R., Allen, E., Hurlbut, S. C., Kim, S. W., Rajaraman, S., Singh, P., Reubi, J. C., & Thompson, J. C. (1991). Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology*, 101(2), 303–311. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(91\)90004-5](https://doi.org/10.1016/0016-5085(91)90004-5)

Faber, C., Horst, D., Hlubek, F., & Kirchner, T. (2011). Overexpression of Dicer predicts poor survival in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 47(9), 1414–1419. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.01.006>

Fagundes, G. F. C., & Almeida, M. Q. (2022). Perioperative Management of Pheochromocytomas and Sympathetic Paragangliomas. *Journal of the Endocrine Society*, 6(2), bvac004. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvac004>

Farh, K. K.-H., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B. P., Johnston, W. K., Lim, L. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). The Widespread Impact of Mammalian MicroRNAs on mRNA Repression and Evolution. *Science*, 310(5755), 1817–1821. <https://doi.org/10.1126/science.1121158>

- Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., & Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(26), 15781–15786. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15781>
- Favier, J., Amar, L., & Gimenez-Roqueplo, A.-P. (2015). Paraganglioma and pheochromocytoma: From genetics to personalized medicine. *Nature Reviews Endocrinology*, *11*(2), 101–111. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.188>
- Feldman, J. M. (1981). Phenylethanolamine-N-methyltransferase activity determines the epinephrine concentration of pheochromocytomas. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, *34*(3), 389–398.
- Feldman, J. M., Blalock, J. A., Zern, R. T., & Wells, S. A. (1979). The Relationship between Enzyme Activity and the Catecholamine Content and Secretion of Pheochromocytomas\*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *49*(3), 445–451. <https://doi.org/10.1210/jcem-49-3-445>
- Fenster, S. D., Chung, W. J., Zhai, R., Cases-Langhoff, C., Voss, B., Garner, A. M., Kaempf, U., Kindler, S., Gundelfinger, E. D., & Garner, C. C. (2000). Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron*, *25*(1), 203–214. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80883-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80883-1)
- Fernández-Chacón, R., Königstorfer, A., Gerber, S. H., García, J., Matos, M. F., Stevens, C. F., Brose, N., Rizo, J., Rosenmund, C., & Südhof, T. C. (2001). Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, *410*(6824), 41–49. <https://doi.org/10.1038/35065004>
- Ferreira, C., Siqueira, D., Romitti, M., Ceolin, L., Brasil, B., Meurer, L., Capp, C., & Maia, A. (2014). Role of VEGF-A and Its Receptors in Sporadic and MEN2-Associated Pheochromocytoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(4), 5323–5336. <https://doi.org/10.3390/ijms15045323>
- Fesce, R., Grohovaz, F., Valtorta, F., & Meldolesi, J. (1994). Neurotransmitter release: Fusion or ‘kiss-and-run’? *Trends in Cell Biology*, *4*(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0962-8924(94)90025-6)
- Filippov, V., Solovyev, V., Filippova, M., & Gill, S. S. (2000). A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene*, *245*(1), 213–221. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00571-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00571-1)

Fish, K. N. (2009). Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy. *Current Protocols in Cytometry*, 50(1). <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy1218s50>

Fishbein, L., Leshchiner, I., Walter, V., Danilova, L., Robertson, A. G., Johnson, A. R., Lichtenberg, T. M., Murray, B. A., Ghayee, H. K., Else, T., Ling, S., Jefferys, S. R., De Cubas, A. A., Wenz, B., Korpershoek, E., Amelio, A. L., Makowski, L., Rathmell, W. K., Gimenez-Roqueplo, A.-P., ... Zmuda, E. (2017). Comprehensive Molecular Characterization of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Cancer Cell*, 31(2), 181–193. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.01.001>

Fishbein, L., & Nathanson, K. L. (2012). Pheochromocytoma and paraganglioma: Understanding the complexities of the genetic background. *Cancer Genetics*, 205(1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2012.01.009>

Fontaine, J., & Le Douarin, N. M. (1977). Analysis of endoderm formation in the avian blastoderm by the use of quail-chick chimaeras. The problem of the neurectodermal origin of the cells of the APUD series. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 41, 209–222.

Frank, F., Sonenberg, N., & Nagar, B. (2010). Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature*, 465(7299), 818–822. <https://doi.org/10.1038/nature09039>

Frankel, F. (1984). A Case of Bilateral, Completely Latent Adrenal Tumor and Concurrent Nephritis with Changes in the Circulatory System and Retinitis. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 34(2), 93–106. <https://doi.org/10.3322/canjclin.34.2.93>

Friedländer, M. R., Mackowiak, S. D., Li, N., Chen, W., & Rajewsky, N. (2012). miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Research*, 40(1), 37–52. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr688>

Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), 92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>

Friese, R. S., Altshuler, A. E., Zhang, K., Miramontes-Gonzalez, J. P., Hightower, C. M., Jirout, M. L., Salem, R. M., Gayen, J. R., Mahapatra, N. R., Biswas, N., Cale, M., Vaingankar, S. M.,

- Kim, H.-S., Courel, M., Taupenot, L., Ziegler, M. G., Schork, N. J., Pravenec, M., Mahata, S. K., ... O'Connor, D. T. (2013). MicroRNA-22 and promoter motif polymorphisms at the Chga locus in genetic hypertension: Functional and therapeutic implications for gene expression and the pathogenesis of hypertension. *Human Molecular Genetics*, 22(18), 3624–3640. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt213>
- Fulop, T., Radabaugh, S., & Smith, C. (2005). Activity-Dependent Differential Transmitter Release in Mouse Adrenal Chromaffin Cells. *The Journal of Neuroscience*, 25(32), 7324–7332. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2042-05.2005>
- Fung, M. M., Viveros, O. H., & O'Connor, D. T. (2007). Diseases of the adrenal medulla: Diseases of the adrenal medulla. *Acta Physiologica*, 192(2), 325–335. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01809.x>
- Furlan, A., Dyachuk, V., Kastriti, M. E., Calvo-Enrique, L., Abdo, H., Hadjab, S., Chontorotzea, T., Akkuratova, N., Usoskin, D., Kamenev, D., Petersen, J., Sunadome, K., Memic, F., Marklund, U., Fried, K., Topilko, P., Lallemand, F., Kharchenko, P. V., Ernfors, P., & Adameyko, I. (2017). Multipotent peripheral glial cells generate neuroendocrine cells of the adrenal medulla. *Science*, 357(6346), eaal3753. <https://doi.org/10.1126/science.aal3753>
- Garcia-Manteiga, J. M., D'Alessandro, R., & Meldolesi, J. (2019). News about the Role of the Transcription Factor REST in Neurons: From Physiology to Pathology. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 235. <https://doi.org/10.3390/ijms21010235>
- Garg, M., Kharb, S., Brar, K., Gundgurthi, A., & Mittal, R. (2011). Medical management of pheochromocytoma: Role of the endocrinologist. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 15(8), 329. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.86976>
- Garibotto, G., Tessari, P., Verzola, D., & Dertenois, L. (2002). The metabolic conversion of phenylalanine into tyrosine in the human kidney: Does it have nutritional implications in renal patients? *Journal of Renal Nutrition*, 12(1), 8–16. <https://doi.org/10.1053/jren.2002.29600>
- Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Malacombe, M., Way, M., & Bader, M.-F. (2004). Regulated Exocytosis in Neuroendocrine Cells: A Role for Subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced Actin Filaments. *Molecular Biology of the Cell*, 15(2), 520–531. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-06-0402>
- Gebert, L. F. R., & MacRae, I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(1), 21–37. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7>

Geisler, L., Mohr, R., Lambrecht, J., Knorr, J., Jann, H., Loosen, S. H., Özdirik, B., Luedde, T., Hammerich, L., Tacke, F., Wree, A., Hellberg, T., & Roderburg, C. (2021). The Role of miRNA in the Pathophysiology of Neuroendocrine Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8569. <https://doi.org/10.3390/ijms22168569>

Ghadri, J.-R., Wittstein, I. S., Prasad, A., Sharkey, S., Dote, K., Akashi, Y. J., Cammann, V. L., Crea, F., Galiuto, L., Desmet, W., Yoshida, T., Manfredini, R., Eitel, I., Kosuge, M., Nef, H. M., Deshmukh, A., Lerman, A., Bossone, E., Citro, R., ... Templin, C. (2018). International Expert Consensus Document on Takotsubo Syndrome (Part I): Clinical Characteristics, Diagnostic Criteria, and Pathophysiology. *European Heart Journal*, 39(22), 2032–2046. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy076>

Ghayee, H. K., Bhagwandin, V. J., Stastny, V., Click, A., Ding, L.-H., Mizrachi, D., Zou, Y. S., Chari, R., Lam, W. L., Bachoo, R. M., Smith, A. L., Story, M. D., Sidhu, S., Robinson, B. G., Nwariaku, F. E., Gazdar, A. F., Auchus, R. J., & Shay, J. W. (2013). Progenitor Cell Line (hPheo1) Derived from a Human Pheochromocytoma Tumor. *PLoS ONE*, 8(6), e65624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065624>

Gimenez-Roqueplo, A.-P., Favier, J., Rustin, P., Rieubland, C., Crespin, M., Nau, V., Khau Van Kien, P., Corvol, P., Plouin, P.-F., Jeunemaitre, X., & COMETE Network. (2003). Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas. *Cancer Research*, 63(17), 5615–5621.

Gomi, H., Mizutani, S., Kasai, K., Itohara, S., & Izumi, T. (2005). Granuphilin molecularly docks insulin granules to the fusion machinery. *The Journal of Cell Biology*, 171(1), 99–109. <https://doi.org/10.1083/jcb.200505179>

Greene, L. A., & Rein, G. (1977). Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive pheochromocytoma cells. *Brain Research*, 129(2), 247–263. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90005-1)

Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(7), 2424–2428. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.7.2424>

Gregory, R. I., Yan, K., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014), 235–240. <https://doi.org/10.1038/nature03120>

- Grimson, A., Farh, K. K.-H., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., & Bartel, D. P. (2007). MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Molecular Cell*, *27*(1), 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.017>
- Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B. J., Chiang, H. R., King, N., Degan, B. M., Rokhsar, D. S., & Bartel, D. P. (2008). Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature*, *455*(7217), 1193–1197. <https://doi.org/10.1038/nature07415>
- Groffen, A. J., Martens, S., Díez Arazola, R., Cornelisse, L. N., Lozovaya, N., de Jong, A. P. H., Goriounova, N. A., Habets, R. L. P., Takai, Y., Borst, J. G., Brose, N., McMahon, H. T., & Verhage, M. (2010). Doc2b is a high-affinity Ca<sup>2+</sup> sensor for spontaneous neurotransmitter release. *Science (New York, N.Y.)*, *327*(5973), 1614–1618. <https://doi.org/10.1126/science.1183765>
- Grossman, A., Pacak, K., Sawka, A., Lenders, J. W. M., Harlander, D., Peaston, R. T., Reznick, R., Sisson, J., & Eisenhofer, G. (2006). Biochemical Diagnosis and Localization of Pheochromocytoma: Can We Reach a Consensus? *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1073*(1), 332–347. <https://doi.org/10.1196/annals.1353.038>
- Gu, S., Jin, L., Zhang, F., Sarnow, P., & Kay, M. A. (2009). Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*(2), 144–150. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1552>
- Guérineau, N. C. (2020). Cholinergic and peptidergic neurotransmission in the adrenal medulla: A dynamic control of stimulus-secretion coupling. *IUBMB Life*, *72*(4), 553–567. <https://doi.org/10.1002/iub.2117>
- Gümürdü, A., Yildiz, R., Eren, E., Karakulah, G., Ünver, T., Genç, Ş., & Park, Y. (2017). MicroRNA exocytosis by large dense-core vesicle fusion. *Scientific Reports*, *7*(1), 45661. <https://doi.org/10.1038/srep45661>
- Guo, A.-X., Cui, J.-J., Wang, L.-Y., & Yin, J.-Y. (2020). The role of CSDE1 in translational reprogramming and human diseases. *Cell Communication and Signaling*, *18*(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0496-2>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>

Haase, M., Willenberg, H. S., & Bornstein, S. R. (2011). Update on the Corticomedullary Interaction in the Adrenal Gland. In L. Ghizzoni, M. Cappa, G. P. Chrousos, S. Loche, & M. Maghnie (Eds.), *Endocrine Development* (Vol. 20, pp. 28–37). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000321211>

Haase, V. (2009). The VHL Tumor Suppressor: Master Regulator of HIF. *Current Pharmaceutical Design*, *15*(33), 3895–3903. <https://doi.org/10.2174/138161209789649394>

Hackenberg, M., Rodriguez-Ezpeleta, N., & Aransay, A. M. (2011). miRanalyzer: An update on the detection and analysis of microRNAs in high-throughput sequencing experiments. *Nucleic Acids Research*, *39*(suppl), W132–W138. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr247>

Hadoux, J., Favier, J., Scoazec, J.-Y., Leboulleux, S., Al Ghuzlan, A., Caramella, C., Déandreis, D., Borget, I., Lorient, C., Chougnet, C., Letouzé, E., Young, J., Amar, L., Bertherat, J., Libé, R., Dumont, F., Deschamps, F., Schlumberger, M., Gimenez-Roqueplo, A. P., & Baudin, E. (2014). SDHB mutations are associated with response to temozolomide in patients with metastatic pheochromocytoma or paraganglioma. *International Journal of Cancer*, *135*(11), 2711–2720. <https://doi.org/10.1002/ijc.28913>

Hadrava Vanova, K., Pang, Y., Krobava, L., Kraus, M., Nahacka, Z., Boukalova, S., Pack, S. D., Zobalova, R., Zhu, J., Huynh, T.-T., Jochmanova, I., Uher, O., Hubackova, S., Dvorakova, S., Garrett, T. J., Ghayee, H. K., Wu, X., Schuster, B., Knapp, P. E., ... Pacak, K. (2022). Germline *SUCLG2* Variants in Patients With Pheochromocytoma and Paraganglioma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *114*(1), 130–138. <https://doi.org/10.1093/jnci/djab158>

Haissaguerre, M., Courel, M., Caron, P., Denost, S., Dubessy, C., Gosse, P., Appavoupouille, V., Belleannée, G., Jullié, M.-L., Montero-Hadjadje, M., Yon, L., Corcuff, J.-B., Fagour, C., Mazerolles, C., Wagner, T., Nunes, M.-L., Anouar, Y., & Tabarin, A. (2013). Normotensive Incidentally Discovered Pheochromocytomas Display Specific Biochemical, Cellular, and Molecular Characteristics. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *98*(11), 4346–4354. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1844>

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development*, *18*(24), 3016–3027. <https://doi.org/10.1101/gad.1262504>

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S. Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., & Kim, V. N. (2006). Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by



the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell*, 125(5), 887–901.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.043>

Hanemaaijer, E. S., Margaritis, T., Sanders, K., Bos, F. L., Candelli, T., Al-Saati, H., van Noesel, M. M., Meyer-Wentrup, F. A. G., van de Wetering, M., Holstege, F. C. P., & Clevers, H. (2021). Single-cell atlas of developing murine adrenal gland reveals relation of Schwann cell precursor signature to neuroblastoma phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(5), e2022350118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2022350118>

Hanson, P. I., Heuser, J. E., & Jahn, R. (1997). Neurotransmitter release—Four years of SNARE complexes. *Current Opinion in Neurobiology*, 7(3), 310–315.  
[https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(97\)80057-8](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(97)80057-8)

Hara, M. R., Kovacs, J. J., Whalen, E. J., Rajagopal, S., Strachan, R. T., Grant, W., Towers, A. J., Williams, B., Lam, C. M., Xiao, K., Shenoy, S. K., Gregory, S. G., Ahn, S., Duckett, D. R., & Lefkowitz, R. J. (2011). A stress response pathway regulates DNA damage through  $\beta$ 2-adrenoreceptors and  $\beta$ -arrestin-1. *Nature*, 477(7364), 349–353.  
<https://doi.org/10.1038/nature10368>

Havekes, B., Lai, E. W., Corssmit, E. P. M., Romijn, J. A., Timmers, H. J. L. M., & Pacak, K. (2008). Detection and treatment of pheochromocytomas and paragangliomas: Current standing of MIBG scintigraphy and future role of PET imaging. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging: Official Publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), [and] Section of the Society Of...*, 52(4), 419–429.

He, E., Lozano, M. A. G., Stringer, S., Watanabe, K., Sakamoto, K., Den Oudsten, F., Koopmans, F., Giamberardino, S. N., Hammerschlag, A., Cornelisse, L. N., Li, K. W., Van Weering, J., Posthuma, D., Smit, A. B., Sullivan, P. F., & Verhage, M. (2018). MIR137 schizophrenia-associated locus controls synaptic function by regulating synaptogenesis, synapse maturation and synaptic transmission. *Human Molecular Genetics*, 27(11), 1879–1891.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddy089>

Heger, P., Probst, P., Hüttner, F. J., Gooßen, K., Proctor, T., Müller-Stich, B. P., Strobel, O., Büchler, M. W., & Diener, M. K. (2017). Evaluation of Open and Minimally Invasive Adrenalectomy: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *World Journal of Surgery*, 41(11), 2746–2757. <https://doi.org/10.1007/s00268-017-4095-3>

Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T., & Tollervey, D. (2013). Mapping the Human miRNA Interactome by CLASH Reveals Frequent Noncanonical Binding. *Cell*, *153*(3), 654–665. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.043>

Herman, J. P. (2022). The neuroendocrinology of stress: Glucocorticoid signaling mechanisms. *Psychoneuroendocrinology*, *137*, 105641. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2021.105641>

Hermeking, H. (2012). MicroRNAs in the p53 network: Micromanagement of tumour suppression. *Nature Reviews Cancer*, *12*(9), 613–626. <https://doi.org/10.1038/nrc3318>

Hjemdahl, P., Belfrage, E., & Daleskog, M. (1979). Vascular and metabolic effects of circulating epinephrine and norepinephrine. Concentration-effect study in dogs. *Journal of Clinical Investigation*, *64*(5), 1221–1228. <https://doi.org/10.1172/JCI109576>

Hoegerle, S., Nitzsche, E., Althoefer, C., Ghanem, N., Manz, T., Brink, I., Reincke, M., Moser, E., & Neumann, H. P. H. (2002). Pheochromocytomas: Detection with <sup>18</sup>F DOPA Whole-Body PET—Initial Results. *Radiology*, *222*(2), 507–512. <https://doi.org/10.1148/radiol.2222010622>

Holland, P. W., Garcia-Fernández, J., Williams, N. A., & Sidow, A. (1994). Gene duplications and the origins of vertebrate development. *Development (Cambridge, England). Supplement*, 125–133.

Holman, M. E., Coleman, H. A., Tonta, M. A., & Parkington, H. C. (1994). Synaptic transmission from splanchnic nerves to the adrenal medulla of guinea-pigs. *The Journal of Physiology*, *478*(1), 115–124. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020235>

Hong, D. S., Kang, Y.-K., Borad, M., Sachdev, J., Ejadi, S., Lim, H. Y., Brenner, A. J., Park, K., Lee, J.-L., Kim, T.-Y., Shin, S., Becerra, C. R., Falchook, G., Stoudemire, J., Martin, D., Kelnar, K., Peltier, H., Bonato, V., Bader, A. G., ... Beg, M. S. (2020). Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. *British Journal of Cancer*, *122*(11), 1630–1637. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0802-1>

Horrigan, F. T., & Bookman, R. J. (1994). Releasable pools and the kinetics of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Neuron*, *13*(5), 1119–1129. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90050-7)

Houy, S., Croisé, P., Gubar, O., Chasserot-Golaz, S., Tryoen-Tóth, P., Bailly, Y., Ory, S., Bader, M.-F., & Gasman, S. (2013). Exocytosis and Endocytosis in Neuroendocrine Cells: Inseparable Membranes! *Frontiers in Endocrinology*, *4*.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00135>

Houy, S., Streit, L., Drissa, I., Rame, M., Decraene, C., Moog, S., Brunaud, L., Lanoix, J., Chelbi, R., Bihain, F., Lacomme, S., Lomazzi, S., Campoli, P., Vix, M., Mutter, D., Paramithiotis, E., Dubessy, C., Vitale, N., Ory, S., & Gasman, S. (2022). Dysfunction of calcium-regulated exocytosis at a single-cell level causes catecholamine hypersecretion in patients with pheochromocytoma. *Cancer Letters*, *543*, 215765. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215765>

Hu, D., Wang, Y., Zhang, H., & Kong, D. (2018). Identification of miR-9 as a negative factor of insulin secretion from beta cells. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *74*(2), 291–299. <https://doi.org/10.1007/s13105-018-0615-3>

Hu, H. Y., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., Zhou, Y. H., Chen, W., & Khaitovich, P. (2009). Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics*, *10*(1), 413. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-413>

Hu, S., Wang, H., Chen, K., Cheng, P., Gao, S., Liu, J., Li, X., & Sun, X. (2015). MicroRNA-34c Downregulation Ameliorates Amyloid- $\beta$ -Induced Synaptic Failure and Memory Deficits by Targeting VAMP2. *Journal of Alzheimer's Disease*, *48*(3), 673–686. <https://doi.org/10.3233/JAD-150432>

Huang, V., Place, R. F., Portnoy, V., Wang, J., Qi, Z., Jia, Z., Yu, A., Shuman, M., Yu, J., & Li, L.-C. (2012). Upregulation of Cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer. *Nucleic Acids Research*, *40*(4), 1695–1707. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr934>

Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, *12*(2), 99–110. <https://doi.org/10.1038/nrg2936>

Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Bálint, É., Tuschl, T., & Zamore, P. D. (2001). A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the *let-7* Small Temporal RNA. *Science*, *293*(5531), 834–838. <https://doi.org/10.1126/science.1062961>

Hwang, H.-W., & Mendell, J. T. (2006). MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *British Journal of Cancer*, *94*(6), 776–780. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603023>

Hwang, H.-W., Wentzel, E. A., & Mendell, J. T. (2007). A Hexanucleotide Element Directs

MicroRNA Nuclear Import. *Science*, 315(5808), 97–100.  
<https://doi.org/10.1126/science.1136235>

Iftikhar, H., & Carney, G. E. (2016). Evidence and potential in vivo functions for biofluid miRNAs: From expression profiling to functional testing: Potential roles of extracellular miRNAs as indicators of physiological change and as agents of intercellular information exchange. *BioEssays*, 38(4), 367–378. <https://doi.org/10.1002/bies.201500130>

Igaz, P., Igaz, I., Nagy, Z., Nyíró, G., Szabó, P. M., Falus, A., Patócs, A., & Rácz, K. (2015). MicroRNAs in adrenal tumors: Relevance for pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(3), 417–428. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1752-7>

Ilanchezian, M., Jha, A., Pacak, K., & Del Rivero, J. (2020). Emerging Treatments for Advanced/Metastatic Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Current Treatment Options in Oncology*, 21(11), 85. <https://doi.org/10.1007/s11864-020-00787-z>

Ishiguro, H., Kim, K. T., Joh, T. H., & Kim, K. S. (1993). Neuron-specific expression of the human dopamine beta-hydroxylase gene requires both the cAMP-response element and a silencer region. *Journal of Biological Chemistry*, 268(24), 17987–17994. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)46802-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)46802-5)

Isobe, K., Nakai, T., Yukimasa, N., Nanmoku, T., Takekoshi, K., & Nomura, F. (1998). Expression of mRNA coding for four catecholamine-synthesizing enzymes in human adrenal pheochromocytomas. *European Journal of Endocrinology*, 383–387. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1380383>

Isobe, K., Tatsuno, I., Yashiro, T., Nanmoku, T., Takekoshi, K., Kawakami, Y., & Nakai, T. (2003). Expression of mRNA for PACAP and its receptors in intra- and extra-adrenal human pheochromocytomas and their relationship to catecholamine synthesis. *Regulatory Peptides*, 110(3), 213–217. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(02\)00209-4](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(02)00209-4)

Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2), 113–127. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>

Janz, R., Goda, Y., Geppert, M., Missler, M., & Südhof, T. C. (1999). SV2A and SV2B function as redundant Ca<sup>2+</sup> regulators in neurotransmitter release. *Neuron*, 24(4), 1003–1016. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81046-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81046-6)

Jäpel, M., Gerth, F., Sakaba, T., Bacetic, J., Yao, L., Koo, S.-J., Maritzen, T., Freund, C., & Haucke, V. (2020). Intersectin-Mediated Clearance of SNARE Complexes Is Required for Fast Neurotransmission. *Cell Reports*, 30(2), 409–420.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.035>

Jarrott, B., & Louis, W. J. (1977). Abnormalities in Enzymes Involved in Catecholamine Synthesis and Catabolism in Pheochromocytoma. *Clinical Science*, 53(6), 529–535. <https://doi.org/10.1042/cs0530529>

Jeffries, C. D., Fried, H. M., & Perkins, D. O. (2011). Nuclear and cytoplasmic localization of neural stem cell microRNAs. *RNA*, 17(4), 675–686. <https://doi.org/10.1261/rna.2006511>

Jimenez, C., Rohren, E., Habra, M. A., Rich, T., Jimenez, P., Ayala-Ramirez, M., & Baudin, E. (2013). Current and future treatments for malignant pheochromocytoma and sympathetic paraganglioma. *Current Oncology Reports*, 15(4), 356–371. <https://doi.org/10.1007/s11912-013-0320-x>

Job, S., Georges, A., Burnichon, N., Buffet, A., Amar, L., Bertherat, J., Bouatia-Naji, N., De Reyniès, A., Drui, D., Lussey-Lepoutre, C., Favier, J., Gimenez-Roqueplo, A.-P., & Castro-Vega, L. J. (2020). Transcriptome Analysis of lncRNAs in Pheochromocytomas and Paragangliomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 105(3), 898–907. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz168>

Jochmanova, I., & Pacak, K. (2018). Genomic Landscape of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Trends in Cancer*, 4(1), 6–9. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.11.001>

Jochmanova, I., Yang, C., Zhuang, Z., & Pacak, K. (2013). Hypoxia-Inducible Factor Signaling in Pheochromocytoma: Turning the Rudder in the Right Direction. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 105(17), 1270–1283. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt201>

John, B., Enright, A. J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., & Marks, D. S. (2004). Human MicroRNA Targets. *PLoS Biology*, 2(11), e363. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020363>

Johnson, R. G. (1988). Accumulation of biological amines into chromaffin granules: A model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiological Reviews*, 68(1), 232–307. <https://doi.org/10.1152/physrev.1988.68.1.232>

Kalis, M., Bolmeson, C., Esguerra, J. L. S., Gupta, S., Edlund, A., Tormo-Badia, N., Speidel, D., Holmberg, D., Mayans, S., Khoo, N. K. S., Wendt, A., Eliasson, L., & Cilio, C. M. (2011).

Beta-Cell Specific Deletion of Dicer1 Leads to Defective Insulin Secretion and Diabetes Mellitus. *PLoS ONE*, 6(12), e29166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029166>

Kato, M. (2023). Identify MicroRNA Targets Using AGO2-CLASH (Cross-linking, Ligation, and Sequencing of Hybrids) and AGO2-CLIP (Cross-Linking and Immuno-Precipitation) in Cells with or Without the MicroRNA of Interest Depleted. In R.-J. Lin (Ed.), *RNA-Protein Complexes and Interactions* (Vol. 2666, pp. 137–147). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3191-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3191-1_10)

Kawamata, T., Seitz, H., & Tomari, Y. (2009). Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(9), 953–960. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1630>

Keenan, R. J., Freymann, D. M., Stroud, R. M., & Walter, P. (2001). The Signal Recognition Particle. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), 755–775. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.755>

Keller-Wood, M. E., & Dallman, M. F. (1984). Corticosteroid Inhibition of ACTH Secretion\*. *Endocrine Reviews*, 5(1), 1–24. <https://doi.org/10.1210/edrv-5-1-1>

Kemp, W. N. (1937). The Adrenal Cortex. *BMJ*, 1(3988), 1194–1197. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.3988.1194>

Kennedy, B., Bigby, T. D., & Ziegler, M. G. (1995). Nonadrenal epinephrine-forming enzymes in humans. Characteristics, distribution, regulation, and relationship to epinephrine levels. *Journal of Clinical Investigation*, 95(6), 2896–2902. <https://doi.org/10.1172/JCI117996>

Képénékian, L., Mognetti, T., Lifante, J.-C., Giraudet, A.-L., Houzard, C., Pinson, S., Borson-Chazot, F., & Combemale, P. (2016). Interest of systematic screening of pheochromocytoma in patients with neurofibromatosis type 1. *European Journal of Endocrinology*, 175(4), 335–344. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-0233>

Kim, D. H., Sætrom, P., Snøve, O., & Rossi, J. J. (2008). MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(42), 16230–16235. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808830105>

Kim, T., Gondré-Lewis, M. C., Arnaoutova, I., & Loh, Y. P. (2006). Dense-Core Secretory Granule Biogenesis. *Physiology*, 21(2), 124–133. <https://doi.org/10.1152/physiol.00043.2005>

Kim, T., Tao-Cheng, J.-H., Eiden, L. E., & Loh, Y. P. (2001). Chromogranin A, an “On/Off”

Switch Controlling Dense-Core Secretory Granule Biogenesis. *Cell*, 106(4), 499–509. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00459-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00459-7)

Kim, Y.-K., Kim, B., & Kim, V. N. (2016). Re-evaluation of the roles of *DROSHA*, *Exportin 5*, and *DICER* in microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(13). <https://doi.org/10.1073/pnas.1602532113>

Kim, Y.-K., & Kim, V. N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *The EMBO Journal*, 26(3), 775–783. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601512>

Kimura, N., Takayanagi, R., Takizawa, N., Itagaki, E., Katabami, T., Kakoi, N., Rakugi, H., Ikeda, Y., Tanabe, A., Nigawara, T., Ito, S., Kimura, I., Naruse, M., & \_\_. (2014). Pathological grading for predicting metastasis in pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocrine-Related Cancer*, 21(3), 405–414. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0494>

Kitlinska, J. (2007). Neuropeptide Y in neural crest-derived tumors: Effect on growth and vascularization. *Cancer Letters*, 245(1–2), 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.01.010>

Kobayashi, K., Morita, S., Sawada, H., Mizuguchi, T., Yamada, K., Nagatsu, I., Hata, T., Watanabe, Y., Fujita, K., & Nagatsu, T. (1995). Targeted Disruption of the Tyrosine Hydroxylase Locus Results in Severe Catecholamine Depletion and Perinatal Lethality in Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 27235–27243. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.27235>

Kocak, S., Aydintug, S., & Canakci, N. (2002). Alpha blockade in preoperative preparation of patients with pheochromocytomas. *International Surgery*, 87(3), 191–194.

Kögel, T., & Gerdes, H.-H. (2009). Maturation of Secretory Granules. In J. F. Rehfeld & J. R. Bundgaard (Eds.), *Cellular Peptide Hormone Synthesis and Secretory Pathways* (Vol. 50, pp. 137–184). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/400\\_2009\\_31](https://doi.org/10.1007/400_2009_31)

Koh, J.-M., Ahn, S. H., Kim, H., Kim, B.-J., Sung, T.-Y., Kim, Y. H., Hong, S. J., Song, D. E., & Lee, S. H. (2017). Validation of pathological grading systems for predicting metastatic potential in pheochromocytoma and paraganglioma. *PLOS ONE*, 12(11), e0187398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187398>

Kokotos, A. C., Peltier, J., Davenport, E. C., Trost, M., & Cousin, M. A. (2018). Activity-dependent bulk endocytosis proteome reveals a key presynaptic role for the monomeric GTPase

Rab11. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(43).  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1809189115>

Kölby, L., Bernhardt, P., Ahlman, H., Wängberg, B., Johanson, V., Wigander, A., Forssell-Aronsson, E., Karlsson, S., Ahrén, B., Stenman, G., & Nilsson, O. (2001). A Transplantable Human Carcinoid as Model for Somatostatin Receptor-Mediated and Amine Transporter-Mediated Radionuclide Uptake. *The American Journal of Pathology*, 158(2), 745–755.  
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64017-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64017-5)

Kondratenko, T. Y., Zacharova, I. V., Kuzina, N. V., Katukov VYu, null, Severin, E. S., Kornilova, Z. C., & Perelman, M. I. (1993). Alterations in human lung adrenergic receptors in cancer. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 29(1), 123–130.

Kononenko, N. L., & Haucke, V. (2015). Molecular Mechanisms of Presynaptic Membrane Retrieval and Synaptic Vesicle Reformation. *Neuron*, 85(3), 484–496.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.016>

Kooijman, E. E., Chupin, V., De Kruijff, B., & Burger, K. N. J. (2003). Modulation of Membrane Curvature by Phosphatidic Acid and Lysophosphatidic Acid: **Biophysical Properties of Phosphatidic Acid and Lysophosphatidic Acid**. *Traffic*, 4(3), 162–174.  
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00086.x>

Kővári, B., Turkevi-Nagy, S., Báthori, Á., Fekete, Z., & Krenács, L. (2020). Syntaxin 1: A Novel Robust Immunophenotypic Marker of Neuroendocrine Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1213. <https://doi.org/10.3390/ijms21041213>

Kövesdi, A., Kurucz, P. A., Nyírő, G., Darvasi, O., Patócs, A., & Butz, H. (2020). Circulating miRNA Increases the Diagnostic Accuracy of Chromogranin A in Metastatic Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Cancers*, 12(9), 2488. <https://doi.org/10.3390/cancers12092488>

Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D155–D162.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>

Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D68–D73.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1181>

Krek, A., Grün, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., Da



- Piedade, I., Gunsalus, K. C., Stoffel, M., & Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*, *37*(5), 495–500. <https://doi.org/10.1038/ng1536>
- Krokker, L., Patócs, A., & Butz, H. (2021). Essential Role of the 14q32 Encoded miRNAs in Endocrine Tumors. *Genes*, *12*(5), 698. <https://doi.org/10.3390/genes12050698>
- Kumar, M. S., Lu, J., Mercer, K. L., Golub, T. R., & Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nature Genetics*, *39*(5), 673–677. <https://doi.org/10.1038/ng2003>
- Kvetňanský, R., & Mikulaj, L. (1970). Adrenal and Urinary Catecholamines in Rats During Adaptation to Repeated Immobilization Stress. *Endocrinology*, *87*(4), 738–743. <https://doi.org/10.1210/endo-87-4-738>
- La Batide-Alanore, A., Chatellier, G., & Plouin, P.-F. (2003). Diabetes as a marker of pheochromocytoma in hypertensive patients: *Journal of Hypertension*, *21*(9), 1703–1707. <https://doi.org/10.1097/00004872-200309000-00020>
- Laganà, A., Russo, F., Sismeiro, C., Giugno, R., Pulvirenti, A., & Ferro, A. (2010). Variability in the Incidence of miRNAs and Genes in Fragile Sites and the Role of Repeats and CpG Islands in the Distribution of Genetic Material. *PLoS ONE*, *5*(6), e11166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011166>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science*, *294*(5543), 853–858. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>
- Lal, A., Kim, H. H., Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Pullmann, R., Srikantan, S., Subrahmanyam, R., Martindale, J. L., Yang, X., Ahmed, F., Navarro, F., Dykxhoorn, D., Lieberman, J., & Gorospe, M. (2008). p16INK4a Translation Suppressed by miR-24. *PLoS ONE*, *3*(3), e1864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001864>
- Lam, K.-Y., Chan, A. C.-L., & Lo, C.-Y. (2001). Morphological Analysis of Adrenal Glands: A Prospective Analysis. *Endocrine Pathology*, *12*(1), 33–38. <https://doi.org/10.1385/EP:12:1:33>
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N. D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foà, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., ... Tuschl, T. (2007). A Mammalian microRNA

Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell*, 129(7), 1401–1414. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.040>

Lang, H., Ai, Z., You, Z., Wan, Y., Guo, W., Xiao, J., & Jin, X. (2015). Characterization of miR-218/322-Stxbp1 pathway in the process of insulin secretion. *Journal of Molecular Endocrinology*, 54(1), 65–73. <https://doi.org/10.1530/JME-14-0305>

Latreille, M., Hausser, J., Stützer, I., Zhang, Q., Hastoy, B., Gargani, S., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Zavolan, M., Esguerra, J. L. S., Eliasson, L., Rüllicke, T., Rorsman, P., & Stoffel, M. (2014). MicroRNA-7a regulates pancreatic  $\beta$  cell function. *Journal of Clinical Investigation*, 124(6), 2722–2735. <https://doi.org/10.1172/JCI73066>

Lawrence, B., Gustafsson, B. I., Kidd, M., Pavel, M., Svejda, B., & Modlin, I. M. (2011). The Clinical Relevance of Chromogranin A as a Biomarker for Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 40(1), 111–134. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2010.12.001>

Lazzell, D. R., Belizaire, R., Thakur, P., Sherry, D. M., & Janz, R. (2004). SV2B regulates synaptotagmin 1 by direct interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52124–52131. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407502200>

Lee, C.-T., Risom, T., & Strauss, W. M. (2007). Evolutionary Conservation of MicroRNA Regulatory Circuits: An Examination of MicroRNA Gene Complexity and Conserved MicroRNA-Target Interactions through Metazoan Phylogeny. *DNA and Cell Biology*, 26(4), 209–218. <https://doi.org/10.1089/dna.2006.0545>

Lee, H. Y., & Doudna, J. A. (2012). TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. *RNA*, 18(11), 2012–2019. <https://doi.org/10.1261/rna.035501.112>

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)

Lee, Y. (2002). MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, 21(17), 4663–4670. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf476>

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>

- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, *23*(20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Lee, Y.-Y., Lee, H., Kim, H., Kim, V. N., & Roh, S.-H. (2023). Structure of the human DICER–pre-miRNA complex in a dicing state. *Nature*, *615*(7951), 331–338. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05723-3>
- Lefebvre, H., Thomas, M., Duparc, C., Bertherat, J., & Louiset, E. (2016). Role of ACTH in the Interactive/Paracrine Regulation of Adrenal Steroid Secretion in Physiological and Pathophysiological Conditions. *Frontiers in Endocrinology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00098>
- Lehnert, H. (1998). Regulation of catecholamine synthesizing enzyme gene expression in human pheochromocytoma. *European Journal of Endocrinology*, *363–367*. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1380363>
- Lenders, J. W. M., Duh, Q.-Y., Eisenhofer, G., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Grebe, S. K. G., Murad, M. H., Naruse, M., Pacak, K., & Young, W. F. (2014). Pheochromocytoma and Paraganglioma: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *99*(6), 1915–1942. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1498>
- Lenders, J. W. M., Pacak, K., Walther, M. M., Linehan, W. M., Mannelli, M., Friberg, P., Keiser, H. R., Goldstein, D. S., & Eisenhofer, G. (2002). Biochemical Diagnosis of Pheochromocytoma: Which Test Is Best? *JAMA*, *287*(11). <https://doi.org/10.1001/jama.287.11.1427>
- Letouzé, E., Martinelli, C., Lorient, C., Burnichon, N., Abermil, N., Ottolenghi, C., Janin, M., Menara, M., Nguyen, A. T., Benit, P., Buffet, A., Marcaillou, C., Bertherat, J., Amar, L., Rustin, P., De Reyniès, A., Gimenez-Roqueplo, A.-P., & Favier, J. (2013). SDH Mutations Establish a Hypermethylator Phenotype in Paraganglioma. *Cancer Cell*, *23*(6), 739–752. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.018>
- Levine, A. J., Finlay, C. A., & Hinds, P. W. (2004). P53 is a tumor suppressor gene. *Cell*, *116*, S67–S70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00036-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00036-4)
- Li, D., Xu, M., Wang, Z., Huang, P., Huang, C., Chen, Z., Tang, G., Zhu, X., Cai, M., & Qin, S. (2022). The EMT-induced lncRNA NR2F1-AS1 positively modulates NR2F1 expression and drives gastric cancer via miR-29a-3p/VAMP7 axis. *Cell Death & Disease*, *13*(1), 84.

<https://doi.org/10.1038/s41419-022-04540-2>

Li, L., Wang, X., & Liu, D. (2019). MicroRNA-185 inhibits proliferation, migration and invasion in human osteosarcoma MG63 cells by targeting vesicle-associated membrane protein 2. *Gene*, *696*, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.01.034>

Li, S.-C., Chan, W.-C., Hu, L.-Y., Lai, C.-H., Hsu, C.-N., & Lin, W. (2010). Identification of homologous microRNAs in 56 animal genomes. *Genomics*, *96*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.03.009>

Li, Y., Qiu, C., Tu, J., Geng, B., Yang, J., Jiang, T., & Cui, Q. (2014). HMDD v2.0: A database for experimentally supported human microRNA and disease associations. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D1070–D1074. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1023>

Liang, Y.-C., Wu, Y.-P., Chen, D.-N., Chen, S.-H., Li, X.-D., Sun, X.-L., Wei, Y., Ning, X., & Xue, X.-Y. (2018). Building a Competing Endogenous RNA Network to Find Potential Long Non-Coding RNA Biomarkers for Pheochromocytoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *51*(6), 2916–2924. <https://doi.org/10.1159/000496043>

Lin, R.-J., Lin, Y.-C., Chen, J., Kuo, H.-H., Chen, Y.-Y., Diccianni, M. B., London, W. B., Chang, C.-H., & Yu, A. L. (2010). microRNA Signature and Expression of *Dicer* and *Drosha* Can Predict Prognosis and Delineate Risk Groups in Neuroblastoma. *Cancer Research*, *70*(20), 7841–7850. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0970>

Liu, H., Yue, D., Chen, Y., Gao, S.-J., & Huang, Y. (2010). Improving performance of mammalian microRNA target prediction. *BMC Bioinformatics*, *11*(1), 476. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-476>

Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J., & Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature Cell Biology*, *7*(7), 719–723. <https://doi.org/10.1038/ncb1274>

Liu, J., Verweij, F. J., Van Niel, G., Danglot, L., & Bun, P. (2022). *ExoJ: An ImageJ2/Fiji plugin for automated spatiotemporal detection of exocytosis* [Preprint]. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1101/2022.09.05.506585>

Liu, Q., Tang, H., Liu, X., Liao, Y., Li, H., Zhao, Z., Yuan, X., & Jiang, W. (2014). miR-200b as a prognostic factor targets multiple members of RAB family in glioma. *Medical Oncology*, *31*(3), 859. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0859-x>

- Liu, X., Wu, W. K. K., Yu, L., Li, Z. J., Sung, J. J. Y., Zhang, S. T., & Cho, C. H. (2008). Epidermal Growth Factor-Induced Esophageal Cancer Cell Proliferation Requires Transactivation of  $\beta$ -Adrenoceptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326(1), 69–75. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.134528>
- Livett, B. G., Day, R., Elde, R. P., & Howe, P. R. C. (1982). Co-storage of enkephalins and adrenaline in the bovine adrenal medulla. *Neuroscience*, 7(5), 1323–1332. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(82\)91138-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(82)91138-1)
- Lopez, A.-G., Duparc, C., Renouf, S., Machevin, E., Le Guillou, V., Sabourin, J.-C., Defortescu, G., Buffet, A., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Dubessy, C., Louiset, E., & Lefebvre, H. (2022). Expression of LHCGR in Pheochromocytomas Unveils an Endocrine Mechanism Connecting Pregnancy and Epinephrine Overproduction. *Hypertension*, 79(5), 1006–1016. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.18864>
- Lopez Ruiz, J. R., Ernst, S. A., Holz, R. W., & Stuenkel, E. L. (2022). Basal and Stress-Induced Network Activity in the Adrenal Medulla In Vivo. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 875865. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.875865>
- Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner Zu Siederdisen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F., & Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*, 6(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26>
- Loriot, C., Domingues, M., Berger, A., Menara, M., Ruel, M., Morin, A., Castro-Vega, L.-J., Letouzé, É., Martinelli, C., Bemelmans, A.-P., Larue, L., Gimenez-Roqueplo, A.-P., & Favier, J. (2015). Deciphering the molecular basis of invasiveness in Sdhb-deficient cells. *Oncotarget*, 6(32), 32955–32965. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5106>
- Lovis, P., Gattesco, S., & Regazzi, R. (2008). Regulation of the expression of components of the exocytotic machinery of insulin-secreting cells by microRNAs. *Bchm*, 389(3), 305–312. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.026>
- Lovis, P., Roggli, E., Laybutt, D. R., Gattesco, S., Yang, J.-Y., Widmann, C., Abderrahmani, A., & Regazzi, R. (2008). Alterations in MicroRNA Expression Contribute to Fatty Acid-Induced Pancreatic  $\beta$ -Cell Dysfunction. *Diabetes*, 57(10), 2728–2736. <https://doi.org/10.2337/db07-1252>
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., & Golub,

- T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, *435*(7043), 834–838. <https://doi.org/10.1038/nature03702>
- Lu, Y., Li, P., Gan, W., Zhao, X., Shen, S., Feng, W., Xu, Q., Bi, Y., Guo, H., & Zhu, D. (2016). Clinical and Pathological Characteristics of Hypertensive and Normotensive Adrenal Pheochromocytomas. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, *124*(6), 372–379. <https://doi.org/10.1055/s-0042-100911>
- Lujambio, A., Calin, G. A., Villanueva, A., Ropero, S., Sánchez-Céspedes, M., Blanco, D., Montuenga, L. M., Rossi, S., Nicoloso, M. S., Faller, W. J., Gallagher, W. M., Eccles, S. A., Croce, C. M., & Esteller, M. (2008). A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(36), 13556–13561. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803055105>
- Lussey-Lepoutre, C., Buffet, A., Gimenez-Roqueplo, A.-P., & Favier, J. (2017). Mitochondrial Deficiencies in the Predisposition to Paraganglioma. *Metabolites*, *7*(2), 17. <https://doi.org/10.3390/metabo7020017>
- Lymperopoulos, A., Brill, A., & McCrink, K. A. (2016). GPCRs of adrenal chromaffin cells & catecholamines: The plot thickens. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *77*, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.02.003>
- Lyubimova, N. V., Churikova, T. K., & Kushlinskii, N. E. (2016). Chromogranin As a Biochemical Marker of Neuroendocrine Tumors. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, *160*(5), 702–704. <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3254-0>
- MacRae, I. J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A. N., Cande, W. Z., Adams, P. D., & Doudna, J. A. (2006). Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science*, *311*(5758), 195–198. <https://doi.org/10.1126/science.1121638>
- Mains, R. E., Cullen, E. I., May, V., & Eipper, B. A. (1987). The Role of Secretory Granules in Peptide Biosynthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *493*(1 Cellular and), 278–291. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb27213.x>
- Malec, K., Miśkiewicz, P., Witkowska, A., Krajewska, E., Toutounchi, S., Gałązka, Z., Piotrowski, M., Kaćka, A., Bednarczuk, T., & Ambroziak, U. (2017). Comparison of phenoxybenzamine and doxazosin in perioperative management of patients with pheochromocytoma. *Kardiologia Polska*, *75*(11), 1192–1198.

<https://doi.org/10.5603/KP.a2017.0147>

Margittai, M., Fasshauer, D., Jahn, R., & Langen, R. (2003). The Habc domain and the SNARE core complex are connected by a highly flexible linker. *Biochemistry*, *42*(14), 4009–4014. <https://doi.org/10.1021/bi027437z>

Marotta, V., Zatelli, M. C., Sciammarella, C., Ambrosio, M. R., Bondanelli, M., Colao, A., & Faggiano, A. (2018). Chromogranin A as circulating marker for diagnosis and management of neuroendocrine neoplasms: More flaws than fame. *Endocrine-Related Cancer*, *25*(1), R11–R29. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0269>

Martin, T. F. J., & Grishanin, R. N. (2003). PC12 Cells as a Model for Studies of Regulated Secretion in Neuronal and Endocrine Cells. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 71, pp. 267–286). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(03\)01012-4](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(03)01012-4)

Masur, K., Niggemann, B., Zanker, K. S., & Entschladen, F. (2001). Norepinephrine-induced migration of SW 480 colon carcinoma cells is inhibited by beta-blockers. *Cancer Research*, *61*(7), 2866–2869.

Mathonnet, G., Fabian, M. R., Svitkin, Y. V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W. C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R. S., Filipowicz, W., Duchaine, T. F., & Sonenberg, N. (2007). MicroRNA Inhibition of Translation Initiation in Vitro by Targeting the Cap-Binding Complex eIF4F. *Science*, *317*(5845), 1764–1767. <https://doi.org/10.1126/science.1146067>

McMahon, H. T., Missler, M., Li, C., & Südhof, T. C. (1995). Complexins: Cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell*, *83*(1), 111–119. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90239-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90239-2)

McNeil, A. R., Blok, B. H., Koelmeyer, T. D., Burke, M. P., & Hilton, J. M. (2000). Pheochromocytomas discovered during coronial autopsies in Sydney, Melbourne and Auckland. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*, *30*(6), 648–652. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2000.tb04358.x>

Merritt, W. M., Lin, Y. G., Han, L. Y., Kamat, A. A., Spannuth, W. A., Schmandt, R., Urbauer, D., Pennacchio, L. A., Cheng, J.-F., Nick, A. M., Deavers, M. T., Mourad-Zeidan, A., Wang, H., Mueller, P., Lenburg, M. E., Gray, J. W., Mok, S., Birrer, M. J., Lopez-Berestein, G., ... Sood, A. K. (2008). Dicer, Drosha, and Outcomes in Patients with Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, *359*(25), 2641–2650. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0803785>

- Mesiano, S., & Jaffe, R. B. (1997). Developmental and Functional Biology of the Primate Fetal Adrenal Cortex\*. *Endocrine Reviews*, *18*(3), 378–403. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.3.0304>
- Meyer-Rochow, G. Y., Jackson, N. E., Conaglen, J. V., Whittle, D. E., Kunnimalaiyaan, M., Chen, H., Westin, G., Sandgren, J., Stålberg, P., Khanafshar, E., Shibru, D., Duh, Q.-Y., Clark, O. H., Kebebew, E., Gill, A. J., Clifton-Bligh, R., Robinson, B. G., Benn, D. E., & Sidhu, S. B. (2010). MicroRNA profiling of benign and malignant pheochromocytomas identifies novel diagnostic and therapeutic targets. *Endocrine-Related Cancer*, *17*(3), 835–846. <https://doi.org/10.1677/ERC-10-0142>
- Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocrine Reviews*, *32*(1), 81–151. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0013>
- Milosevic, I. (2018). Revisiting the Role of Clathrin-Mediated Endocytosis in Synaptic Vesicle Recycling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*, 27. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00027>
- Milosevic, I., Giovedi, S., Lou, X., Raimondi, A., Collesi, C., Shen, H., Paradise, S., O’Toole, E., Ferguson, S., Cremona, O., & De Camilli, P. (2011). Recruitment of Endophilin to Clathrin-Coated Pit Necks Is Required for Efficient Vesicle Uncoating after Fission. *Neuron*, *72*(4), 587–601. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.029>
- Mittendorf, E. A., Evans, D. B., Lee, J. E., & Perrier, N. D. (2007). Pheochromocytoma: Advances in Genetics, Diagnosis, Localization, and Treatment. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *21*(3), 509–525. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2007.04.012>
- Mockly, S., Houbron, É., & Seitz, H. (2022). A rationalized definition of general tumor suppressor microRNAs excludes miR-34a. *Nucleic Acids Research*, *50*(8), 4703–4712. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac277>
- Montesinos, M. S., Machado, J. D., Camacho, M., Diaz, J., Morales, Y. G., Alvarez De La Rosa, D., Carmona, E., Castañeyra, A., Viveros, O. H., O’Connor, D. T., Mahata, S. K., & Borges, R. (2008). The Crucial Role of Chromogranins in Storage and Exocytosis Revealed Using Chromaffin Cells from Chromogranin A Null Mouse. *The Journal of Neuroscience*, *28*(13), 3350–3358. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5292-07.2008>
- Morales, A., Mohan, R., Chen, X., Coffman, B. L., Bendahmane, M., Watch, L., West, J. L., Bakshi, S., Traynor, J. R., Giovannucci, D. R., Kammermeier, P. J., Axelrod, D., Currie, K. P.



- M., Smrcka, A. V., & Anantharam, A. (2023). PACAP and acetylcholine cause distinct Ca<sup>2+</sup> signals and secretory responses in chromaffin cells. *Journal of General Physiology*, *155*(2), e202213180. <https://doi.org/10.1085/jgp.202213180>
- Moran, Y., Agron, M., Praher, D., & Technau, U. (2017). The evolutionary origin of plant and animal microRNAs. *Nature Ecology & Evolution*, *1*(3), 0027. <https://doi.org/10.1038/s41559-016-0027>
- Moreno-Smith, M., Lutgendorf, S. K., & Sood, A. K. (2010). Impact of stress on cancer metastasis. *Future Oncology*, *6*(12), 1863–1881. <https://doi.org/10.2217/fon.10.142>
- Mori, M., Triboulet, R., Mohseni, M., Schlegelmilch, K., Shrestha, K., Camargo, F. D., & Gregory, R. I. (2014). Hippo Signaling Regulates Microprocessor and Links Cell-Density-Dependent miRNA Biogenesis to Cancer. *Cell*, *156*(5), 893–906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.043>
- Morimoto, E., Inagaki, K., Komatsubara, M., Terasaka, T., Itoh, Y., Fujisawa, S., Sasaki, E., Nishiyama, Y., Hara, T., & Wada, J. (2022). Effects of Wnt- $\beta$ -Catenin Signaling and Sclerostin on the Phenotypes of Rat Pheochromocytoma PC12 Cells. *Journal of the Endocrine Society*, *6*(10), bvac121. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvac121>
- Mravec, B. (2005). A new focus on interoceptive properties of adrenal medulla. *Autonomic Neuroscience*, *120*(1–2), 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2005.04.005>
- Murakami, T., Oukouchi, H., Uno, Y., Ohtsuka, A., & Taguchi, T. (1989). Blood vascular beds of rat adrenal and accessory adrenal glands, with special reference to the corticomedullary portal system: A further scanning electron microscopic study of corrosion casts and tissue specimens. *Archives of Histology and Cytology*, *52*(5), 461–476. <https://doi.org/10.1679/aohc.52.461>
- Nankova, B., Kvetnanský, R., McMahon, A., Viskupic, E., Hiremagalur, B., Frankle, G., Fukuhara, K., Kopin, I. J., & Sabban, E. L. (1994). Induction of tyrosine hydroxylase gene expression by a nonneuronal nonpituitary-mediated mechanism in immobilization stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(13), 5937–5941. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.13.5937>
- Neher, E., & Zucker, R. S. (1993). Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron*, *10*(1), 21–30. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90238-M](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90238-M)

- Neumann, H. P. H., Vortmeyer, A., Schmidt, D., Werner, M., Erlic, Z., Cascon, A., Bausch, B., Januszewicz, A., & Eng, C. (2007). Evidence of MEN-2 in the original description of classic pheochromocytoma. *The New England Journal of Medicine*, *357*(13), 1311–1315. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa071407>
- Nguyen, T. A., Jo, M. H., Choi, Y.-G., Park, J., Kwon, S. C., Hohng, S., Kim, V. N., & Woo, J.-S. (2015). Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell*, *161*(6), 1374–1387. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.010>
- Niedergang, F., Vitale, N., & Gasman, S. (Eds.). (2021). *Exocytosis and Endocytosis: Methods and Protocols* (Vol. 2233). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1044-2>
- Niemann, S., & Müller, U. (2000). Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nature Genetics*, *26*(3), 268–270. <https://doi.org/10.1038/81551>
- Niemeijer, N. D., Alblas, G., Van Hulsteijn, L. T., Dekkers, O. M., & Corssmit, E. P. M. (2014). Chemotherapy with cyclophosphamide, vincristine and dacarbazine for malignant paraganglioma and pheochromocytoma: Systematic review and meta-analysis. *Clinical Endocrinology*, *81*(5), 642–651. <https://doi.org/10.1111/cen.12542>
- Nishi, K., Nishi, A., Nagasawa, T., & Ui-Tei, K. (2013). Human TNRC6A is an Argonaute-navigator protein for microRNA-mediated gene silencing in the nucleus. *RNA*, *19*(1), 17–35. <https://doi.org/10.1261/rna.034769.112>
- Nykänen, A., Haley, B., & Zamore, P. D. (2001). ATP Requirements and Small Interfering RNA Structure in the RNA Interference Pathway. *Cell*, *107*(3), 309–321. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00547-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00547-5)
- Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *132*(5), 1033–1044. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.007>
- Oberg, K., Modlin, I. M., De Herder, W., Pavel, M., Klimstra, D., Frilling, A., Metz, D. C., Heaney, A., Kwekkeboom, D., Strosberg, J., Meyer, T., Moss, S. F., Washington, K., Wolin, E., Liu, E., & Goldenring, J. (2015). Consensus on biomarkers for neuroendocrine tumour disease. *The Lancet Oncology*, *16*(9), e435–e446. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00186-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00186-2)
- Ogata, T., & Ogata, A. (1917). HENLE'S REACTION OF THE CHROMAFFIN CELLS IN

THE ADRENALS, AND THE MICROSCOPIC TEST FOR ADRENALIN. *Journal of Experimental Medicine*, 25(6), 807–817. <https://doi.org/10.1084/jem.25.6.807>

Oh, D.-Y., Kim, T.-W., Park, Y. S., Shin, S. J., Shin, S. H., Song, E.-K., Lee, H. J., Lee, K., & Bang, Y.-J. (2012). Phase 2 study of everolimus monotherapy in patients with nonfunctioning neuroendocrine tumors or pheochromocytomas/paragangliomas: Everolimus in Neuroendocrine Tumors. *Cancer*, 118(24), 6162–6170. <https://doi.org/10.1002/cncr.27675>

Okada, N., Lin, C.-P., Ribeiro, M. C., Biton, A., Lai, G., He, X., Bu, P., Vogel, H., Jablons, D. M., Keller, A. C., Wilkinson, J. E., He, B., Speed, T. P., & He, L. (2014). A positive feedback between p53 and *miR-34* miRNAs mediates tumor suppression. *Genes & Development*, 28(5), 438–450. <https://doi.org/10.1101/gad.233585.113>

Ørom, U. A., Nielsen, F. C., & Lund, A. H. (2008). MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. *Molecular Cell*, 30(4), 460–471. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.001>

Osuala, K., Telusma, K., Khan, S. M., Wu, S., Shah, M., Baker, C., Alam, S., Abukenda, I., Fuentes, A., Seifein, H. B., & Ebert, S. N. (2011). Distinctive Left-Sided Distribution of Adrenergic-Derived Cells in the Adult Mouse Heart. *PLoS ONE*, 6(7), e22811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022811>

Pacak, K., Eisenhofer, G., Carrasquillo, J. A., Chen, C. C., Li, S.-T., & Goldstein, D. S. (2001). 6-[<sup>18</sup>F]Fluorodopamine Positron Emission Tomographic (PET) Scanning for Diagnostic Localization of Pheochromocytoma. *Hypertension*, 38(1), 6–8. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.38.1.6>

Pacak, K., & Wimalawansa, S. J. (2015). Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Endocrine Practice*, 21(4), 406–412. <https://doi.org/10.4158/EP14481.RA>

Palfrey, H. C., & Artalejo, C. R. (2003). Secretion: Kiss and Run Caught on Film. *Current Biology*, 13(10), R397–R399. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00320-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00320-8)

Pandit-Taskar, N., Zanzonico, P., Staton, K. D., Carrasquillo, J. A., Reidy-Lagunes, D., Lyashchenko, S., Burnazi, E., Zhang, H., Lewis, J. S., Blasberg, R., Larson, S. M., Weber, W. A., & Modak, S. (2018). Biodistribution and Dosimetry of <sup>18</sup>F-Meta-Fluorobenzylguanidine: A First-in-Human PET/CT Imaging Study of Patients with Neuroendocrine Malignancies. *Journal of Nuclear Medicine*, 59(1), 147–153. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.193169>

- Pang, Y., Lu, Y., Caisova, V., Liu, Y., Bullova, P., Huynh, T.-T., Zhou, Y., Yu, D., Fryszak, Z., Hartmann, I., Taïeb, D., Pacak, K., & Yang, C. (2018). Targeting NAD<sup>+</sup>/PARP DNA Repair Pathway as a Novel Therapeutic Approach to *SDHB* -Mutated Cluster I Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Clinical Cancer Research*, 24(14), 3423–3432. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3406>
- Park, J.-E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D. K., Chang, H., Jee, D., Patel, D. J., & Kim, V. N. (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature*, 475(7355), 201–205. <https://doi.org/10.1038/nature10198>
- Park, Y. (2017). MicroRNA Exocytosis by Vesicle Fusion in Neuroendocrine Cells. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 355. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00355>
- Paroutis, P., Touret, N., & Grinstein, S. (2004). The pH of the Secretory Pathway: Measurement, Determinants, and Regulation. *Physiology*, 19(4), 207–215. <https://doi.org/10.1152/physiol.00005.2004>
- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., & Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408(6808), 86–89. <https://doi.org/10.1038/35040556>
- Patterson, E., Webb, R., Weisbrod, A., Bian, B., He, M., Zhang, L., Holloway, A. K., Krishna, R., Nilubol, N., Pacak, K., & Kebebew, E. (2012). The microRNA expression changes associated with malignancy and *SDHB* mutation in pheochromocytoma. *Endocrine-Related Cancer*, 19(2), 157–166. <https://doi.org/10.1530/ERC-11-0308>
- Pearse, A. G. (1969). The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 17(5), 303–313. <https://doi.org/10.1177/17.5.303>
- Pearse, A. G. E. (1982). The diffuse neuroendocrine system: An extension of the APUD concept. In A. C. Cuello (Ed.), *Co-Transmission* (pp. 223–233). Palgrave Macmillan UK. [https://doi.org/10.1007/978-1-349-06239-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-349-06239-3_10)
- Peaston, R. T., & Weinkove, C. (2004). Measurement of catecholamines and their metabolites. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, 41(1), 17–38.

<https://doi.org/10.1258/000456304322664663>

Pederson, L. C., & Lee, J. E. (2003). Pheochromocytoma. *Current Treatment Options in Oncology*, 4(4), 329–337. <https://doi.org/10.1007/s11864-003-0008-9>

Petersen, C. P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., & Sharp, P. A. (2006). Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells. *Molecular Cell*, 21(4), 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.031>

Peterson, K. J., Beavan, A., Chabot, P. J., McPeck, M. A., Pisani, D., Fromm, B., & Simakov, O. (2022). MicroRNAs as Indicators into the Causes and Consequences of Whole-Genome Duplication Events. *Molecular Biology and Evolution*, 39(1), msab344. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab344>

Pfragner, R., Wirnsberger, G., Niederle, B., Behmel, A., Rinner, I., Mandl, A., Wawrina, F., Luo, J., Adamiker, D., Hoger, H., Ingolic, E., & Schauenstein, K. (1996). Establishment of a continuous cell line from a human carcinoid of the small intestine (KRJ-I). *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.8.3.513>

Pick, L. (1912). Das ganglioma emblionale sympathicum. *Berl Klin Wschr*, 49, 16–22.

Pictet, R. L., Rall, L. B., Phelps, P., & Rutter, W. J. (1976). The Neural Crest and the Origin of the Insulin-Producing and Other Gastrointestinal Hormone-Producing Cells. *Science*, 191(4223), 191–192. <https://doi.org/10.1126/science.1108195>

Pierre, C., Agopianz, M., Brunaud, L., Battaglia-Hsu, S.-F., Max, A., Pouget, C., Nomine, C., Lomazzi, S., Vignaud, J.-M., Weryha, G., Oussalah, A., Gauchotte, G., & Busby-Venner, H. (2019). COPPS, a composite score integrating pathological features, PS100 and SDHB losses, predicts the risk of metastasis and progression-free survival in pheochromocytomas/paragangliomas. *Virchows Archiv*, 474(6), 721–734. <https://doi.org/10.1007/s00428-019-02553-5>

Pinzón, N., Li, B., Martinez, L., Sergeeva, A., Presumey, J., Apparailly, F., & Seitz, H. (2017). microRNA target prediction programs predict many false positives. *Genome Research*, 27(2), 234–245. <https://doi.org/10.1101/gr.205146.116>

Pitchiaya, S., Heinicke, L. A., Park, J. I., Cameron, E. L., & Walter, N. G. (2017). Resolving Subcellular miRNA Trafficking and Turnover at Single-Molecule Resolution. *Cell Reports*, 19(3), 630–642. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.075>

- Plaisance, V., Abderrahmani, A., Perret-Menoud, V., Jacquemin, P., Lemaigre, F., & Regazzi, R. (2006). MicroRNA-9 Controls the Expression of Granuphilin/Slp4 and the Secretory Response of Insulin-producing Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(37), 26932–26942. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601225200>
- Plattner, H., Artalejo, A. R., & Neher, E. (1997). Ultrastructural Organization of Bovine Chromaffin Cell Cortex—Analysis by Cryofixation and Morphometry of Aspects Pertinent to Exocytosis. *Journal of Cell Biology*, *139*(7), 1709–1717. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.7.1709>
- Plouin, P. F., Amar, L., Dekkers, O. M., Fassnacht, M., Gimenez-Roqueplo, A. P., Lenders, J. W. M., Lussey-Lepoutre, C., Steichen, O., & \_\_. (2016). European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline for long-term follow-up of patients operated on for a pheochromocytoma or a paraganglioma. *European Journal of Endocrinology*, *174*(5), G1–G10. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-0033>
- Plouin, P.-F., Duclos, J.-M., Soppelsa, F., Boubilil, G., & Chatellier, G. (2001). Factors Associated with Perioperative Morbidity and Mortality in Patients with Pheochromocytoma: Analysis of 165 Operations at a Single Center <sup>1</sup>. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *86*(4), 1480–1486. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.4.7392>
- Posadas, D. M., & Carthew, R. W. (2014). MicroRNAs and their roles in developmental canalization. *Current Opinion in Genetics & Development*, *27*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2014.03.005>
- Powe, D. G., Voss, M. J., Habashy, H. O., Zänker, K. S., Green, A. R., Ellis, I. O., & Entschladen, F. (2011). Alpha- and beta-adrenergic receptor (AR) protein expression is associated with poor clinical outcome in breast cancer: An immunohistochemical study. *Breast Cancer Research and Treatment*, *130*(2), 457–463. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1371-z>
- Powers, J. (2002). High-Level Expression of Receptor Tyrosine Kinase Ret and Responsiveness to Ret-Activating Ligands in Pheochromocytoma Cell Lines from Neurofibromatosis Knockout Mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *20*(3), 382–389. <https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1139>
- Powers, J. F., Evinger, M. J., Tsokas, P., Bedri, S., Alroy, J., Shahsavari, M., & Tischler, A. S. (2000). Pheochromocytoma cell lines from heterozygous neurofibromatosis knockout mice.

*Cell and Tissue Research*, 302(3), 309–320. <https://doi.org/10.1007/s004410000290>

Poy, M. N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., MacDonald, P. E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P., & Stoffel, M. (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*, 432(7014), 226–230. <https://doi.org/10.1038/nature03076>

Prochnik, S. E., Rokhsar, D. S., & Aboobaker, A. A. (2007). Evidence for a microRNA expansion in the bilaterian ancestor. *Development Genes and Evolution*, 217(1), 73–77. <https://doi.org/10.1007/s00427-006-0116-1>

Quillet, A., Anouar, Y., Lecroq, T., & Dubessy, C. (2021). Prediction methods for microRNA targets in bilaterian animals: Toward a better understanding by biologists. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 5811–5825. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.10.025>

Quillet, A., Saad, C., Ferry, G., Anouar, Y., Vergne, N., Lecroq, T., & Dubessy, C. (2020). Improving Bioinformatics Prediction of microRNA Targets by Ranks Aggregation. *Frontiers in Genetics*, 10, 1330. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01330>

Raber, W., Rafflesberg, W., Bischof, M., Scheuba, C., Niederle, B., Gasic, S., Waldhäusl, W., & Roden, M. (2000). Diagnostic Efficacy of Unconjugated Plasma Metanephrines for the Detection of Pheochromocytoma. *Archives of Internal Medicine*, 160(19), 2957. <https://doi.org/10.1001/archinte.160.19.2957>

Rao, D., Peitzsch, M., Prejbisz, A., Hanus, K., Fassnacht, M., Beuschlein, F., Brugger, C., Fliedner, S., Langton, K., Pamporaki, C., Gudziol, V., Stell, A., Januszewicz, A., Timmers, H. J. L. M., Lenders, J. W. M., & Eisenhofer, G. (2017). Plasma methoxytyramine: Clinical utility with metanephrines for diagnosis of pheochromocytoma and paraganglioma. *European Journal of Endocrinology*, 177(2), 103–113. <https://doi.org/10.1530/EJE-17-0077>

Reda El Sayed, S., Cristante, J., Guyon, L., Denis, J., Chabre, O., & Cherradi, N. (2021). MicroRNA Therapeutics in Cancer: Current Advances and Challenges. *Cancers*, 13(11), 2680. <https://doi.org/10.3390/cancers13112680>

Reiche, E. M. V., Nunes, S. O. V., & Morimoto, H. K. (2004). Stress, depression, the immune system, and cancer. *The Lancet Oncology*, 5(10), 617–625. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01597-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01597-9)

Ribatti, D., Conconi, M. T., & Nussdorfer, G. G. (2007). Nonclassic Endogenous Novel

Regulators of Angiogenesis. *Pharmacological Reviews*, 59(2), 185–205. <https://doi.org/10.1124/pr.59.2.3>

Richter, S., Klink, B., Nacke, B., De Cubas, A. A., Mangelis, A., Rapizzi, E., Meinhardt, M., Skondra, C., Mannelli, M., Robledo, M., Menschikowski, M., & Eisenhofer, G. (2016). Epigenetic Mutation of the Succinate Dehydrogenase C Promoter in a Patient With Two Paragangliomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(2), 359–363. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3856>

Rizo, J. (2022). Molecular Mechanisms Underlying Neurotransmitter Release. *Annual Review of Biophysics*, 51(1), 377–408. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-111821-104732>

Roden, C., Gaillard, J., Kanoria, S., Rennie, W., Barish, S., Cheng, J., Pan, W., Liu, J., Cotsapas, C., Ding, Y., & Lu, J. (2017). Novel determinants of mammalian primary microRNA processing revealed by systematic evaluation of hairpin-containing transcripts and human genetic variation. *Genome Research*, 27(3), 374–384. <https://doi.org/10.1101/gr.208900.116>

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Research*, 14(10a), 1902–1910. <https://doi.org/10.1101/gr.2722704>

Rogli, E., Gattesco, S., Caille, D., Briet, C., Boitard, C., Meda, P., & Regazzi, R. (2012). Changes in MicroRNA Expression Contribute to Pancreatic  $\beta$ -Cell Dysfunction in Prediabetic NOD Mice. *Diabetes*, 61(7), 1742–1751. <https://doi.org/10.2337/db11-1086>

Rudolf, R., Salm, T., Rustom, A., & Gerdes, H.-H. (2001). Dynamics of Immature Secretory Granules: Role of Cytoskeletal Elements during Transport, Cortical Restriction, and F-Actin-dependent Tethering. *Molecular Biology of the Cell*, 12(5), 1353–1365. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.5.1353>

Sætrom, P., Heale, B. S. E., Snøve, O., Aagaard, L., Alluin, J., & Rossi, J. J. (2007). Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Research*, 35(7), 2333–2342. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm133>

Sala, F., Nistri, A., & Criado, M. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells: Nicotinic receptors and chromaffin cells. *Acta Physiologica*, 192(2), 203–212. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01804.x>

Salaün, C., James, D. J., & Chamberlain, L. H. (2004). Lipid Rafts and the Regulation of



Exocytosis: Lipid Rafts and Exocytosis. *Traffic*, 5(4), 255–264. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.0162.x>

Salunkhe, V. A., Ofori, J. K., Gandasi, N. R., Salö, S. A., Hansson, S., Andersson, M. E., Wendt, A., Barg, S., Esguerra, J. L. S., & Eliasson, L. (2017). MiR-335 overexpression impairs insulin secretion through defective priming of insulin vesicles. *Physiological Reports*, 5(21), e13493. <https://doi.org/10.14814/phy2.13493>

Sapirstein, L. A., & Goldman, H. (1958). Adrenal blood flow in the albino rat. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 196(1), 159–162. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1958.196.1.159>

Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions\*. *Endocrine Reviews*, 21(1), 55–89. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389>

Sardi, I., Giunti, L., Bresci, C., Buccoliero, A. M., Degl’Innocenti, D., Cardellicchio, S., Baroni, G., Castiglione, F., Ros, M. D., Fiorini, P., Giglio, S., Genitori, L., Aricò, M., & Filippi, L. (2013). Expression of  $\beta$ -adrenergic receptors in pediatric malignant brain tumors. *Oncology Letters*, 5(1), 221–225. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.989>

Schinner, S., & Bornstein, S. R. (2005). Cortical–Chromaffin Cell Interactions in the Adrenal Gland. *Endocrine Pathology*, 16(2), 091–098. <https://doi.org/10.1385/EP:16:2:091>

Schneller, J., Reiser, M., Beuschlein, F., Osswald, A., Pallauf, A., Riester, A., Tietze, J. K., Reincke, M., & Degenhart, C. (2014). Linear and Volumetric Evaluation of the Adrenal Gland—MDCT-Based Measurements of the Adrenals. *Academic Radiology*, 21(11), 1465–1474. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2014.06.008>

Schoch, S., Castillo, P. E., Jo, T., Mukherjee, K., Geppert, M., Wang, Y., Schmitz, F., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2002). RIM1 $\alpha$  forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature*, 415(6869), 321–326. <https://doi.org/10.1038/415321a>

Scriba, L. D., Bornstein, S. R., Santambrogio, A., Mueller, G., Huebner, A., Hauer, J., Schedl, A., Wielockx, B., Eisenhofer, G., Andoniadou, C. L., & Steenblock, C. (2020). Cancer Stem Cells in Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 79. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00079>

Seitz, H., & Zamore, P. D. (2006). Rethinking the Microprocessor. *Cell*, 125(5), 827–829.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.018>

Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., & Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, *455*(7209), 58–63. <https://doi.org/10.1038/nature07228>

Semenza, G. L. (2001). Hypoxia-inducible factor 1: Oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends in Molecular Medicine*, *7*(8), 345–350. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(01\)02090-1](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(01)02090-1)

Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., & Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biology*, *5*(3), R13. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-3-r13>

Shankavaram, U., Fliedner, S. M. J., Elkahloun, A. G., Barb, J. J., Munson, P. J., Huynh, T. T., Matro, J. C., Turkova, H., Linehan, W. M., Timmers, H. J., Tischler, A. S., Powers, J. F., De Krijger, R., Baysal, B. E., Takacova, M., Pastorekova, S., Gius, D., Lehnert, H., Camphausen, K., & Pacak, K. (2013). Genotype and Tumor Locus Determine Expression Profile of Pseudohypoxic Pheochromocytomas and Paragangliomas. *Neoplasia*, *15*(4), 435-IN22. <https://doi.org/10.1593/neo.122132>

Sharma, M., Burré, J., & Südhof, T. C. (2011). CSP $\alpha$  promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity. *Nature Cell Biology*, *13*(1), 30–39. <https://doi.org/10.1038/ncb2131>

Sharma, M., & M. Flood, P. (2019). Adrenergic Receptors as Pharmacological Targets for Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. In R. Chuen-Chung Chang & Y.-S. Ho (Eds.), *Neuroprotection*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81343>

Sheu-Gruttadauria, J., & MacRae, I. J. (2018). Phase Transitions in the Assembly and Function of Human miRISC. *Cell*, *173*(4), 946-957.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.051>

Shi, Z., & Baumgart, T. (2015). Membrane tension and peripheral protein density mediate membrane shape transitions. *Nature Communications*, *6*(1), 5974. <https://doi.org/10.1038/ncomms6974>

Shin, C., Nam, J.-W., Farh, K. K.-H., Chiang, H. R., Shkumatava, A., & Bartel, D. P. (2010). Expanding the MicroRNA Targeting Code: Functional Sites with Centered Pairing. *Molecular*

*Cell*, 38(6), 789–802. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.005>

Shvarts-Serebro, I., Sheinin, A., Gottfried, I., Adler, L., Schottlender, N., Ashery, U., & Barak, B. (2021). miR-128 as a Regulator of Synaptic Properties in 5xFAD Mice Hippocampal Neurons. *Journal of Molecular Neuroscience*, 71(12), 2593–2607. <https://doi.org/10.1007/s12031-021-01862-2>

Siddik-Sayyid, S. M., Dabbous, A. S., Shaaban, J. A., Daaboul, D. G., & Baraka, A. S. (2007). Catastrophic Cardiac Hypokinesia and Multiple-Organ Failure After Surgery in a Patient With an Undiagnosed Pheochromocytoma: Emergency Excision of the Tumor. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 21(6), 863–866. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2006.08.008>

Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 31–39. <https://doi.org/10.1038/35036052>

Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., & Rothman, J. E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, 75(3), 409–418. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90376-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90376-2)

Sørensen, J. B., Wiederhold, K., Müller, E. M., Milosevic, I., Nagy, G., De Groot, B. L., Grubmüller, H., & Fasshauer, D. (2006). Sequential N- to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles. *The EMBO Journal*, 25(5), 955–966. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601003>

Soykan, T., Kaempf, N., Sakaba, T., Vollweiter, D., Goerdeler, F., Puchkov, D., Kononenko, N. L., & Haucke, V. (2017). Synaptic Vesicle Endocytosis Occurs on Multiple Timescales and Is Mediated by Formin-Dependent Actin Assembly. *Neuron*, 93(4), 854–866.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.011>

Stark, A., Brennecke, J., Bushati, N., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2005). Animal MicroRNAs Confer Robustness to Gene Expression and Have a Significant Impact on 3'UTR Evolution. *Cell*, 123(6), 1133–1146. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.023>

Stevens, D. R., Wu, Z.-X., Matti, U., Junge, H. J., Schirra, C., Becherer, U., Wojcik, S. M., Brose, N., & Rettig, J. (2005). Identification of the Minimal Protein Domain Required for Priming Activity of Munc13-1. *Current Biology*, 15(24), 2243–2248. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.055>

Stevens, Ronald E., & Moore, George E. (1983). INADEQUACY OF APUD CONCEPT IN EXPLAINING PRODUCTION OF PEPTIDE HORMONES BY TUMOURS. *The Lancet*, 321(8316), 118–119. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)91756-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)91756-7)

Su, X., Liang, H., Wang, H., Chen, G., Jiang, H., Wu, Q., Liu, T., Liu, Q., Yu, T., Gu, Y., Yang, B., & Shan, H. (2017). Over-expression of microRNA-1 causes arrhythmia by disturbing intracellular trafficking system. *Scientific Reports*, 7(1), 46259. <https://doi.org/10.1038/srep46259>

Sudhof, T. C., & Rizo, J. (2011). Synaptic Vesicle Exocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), a005637–a005637. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005637>

Sulkowski, P. L., Oeck, S., Dow, J., Economos, N. G., Mirfakhraie, L., Liu, Y., Noronha, K., Bao, X., Li, J., Shuch, B. M., King, M. C., Bindra, R. S., & Glazer, P. M. (2020). Oncometabolites suppress DNA repair by disrupting local chromatin signalling. *Nature*, 582(7813), 586–591. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2363-0>

Sun, Y., Zhou, S., Shi, Y., Zhou, Y., Zhang, Y., Liu, K., Zhu, Y., & Han, X. (2020). Inhibition of miR-153, an IL-1 $\beta$ -responsive miRNA, prevents beta cell failure and inflammation-associated diabetes. *Metabolism*, 111, 154335. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154335>

Sutton, M. G., Sheps, S. G., & Lie, J. T. (1981). Prevalence of clinically unsuspected pheochromocytoma. Review of a 50-year autopsy series. *Mayo Clinic Proceedings*, 56(6), 354–360.

Taïeb, D., Hicks, R. J., Hindié, E., Guillet, B. A., Avram, A., Ghedini, P., Timmers, H. J., Scott, A. T., Elojeimy, S., Rubello, D., Virgolini, I. J., Fanti, S., Balogova, S., Pandit-Taskar, N., & Pacak, K. (2019). European Association of Nuclear Medicine Practice Guideline/Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Procedure Standard 2019 for radionuclide imaging of pheochromocytoma and paraganglioma. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 46(10), 2112–2137. <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04398-1>

Taïeb, D., Sebag, F., Barlier, A., Tessonier, L., Palazzo, F. F., Morange, I., Niccoli-Sire, P., Fakhry, N., De Micco, C., Cammilleri, S., Enjalbert, A., Henry, J.-F., & Mundler, O. (2009). <sup>18</sup>F-FDG Avidity of Pheochromocytomas and Paragangliomas: A New Molecular Imaging Signature? *Journal of Nuclear Medicine*, 50(5), 711–717. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.060731>

- Takahashi, Y., Sipp, D., & Enomoto, H. (2013). Tissue Interactions in Neural Crest Cell Development and Disease. *Science*, *341*(6148), 860–863. <https://doi.org/10.1126/science.1230717>
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S. A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., ... Jahn, R. (2006). Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell*, *127*(4), 831–846. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.030>
- Tanguy, E., Wolf, A., Montero-Hadjadje, M., Gasman, S., Bader, M.-F., & Vitale, N. (2021). Phosphatidic acid: Mono- and poly-unsaturated forms regulate distinct stages of neuroendocrine exocytosis. *Advances in Biological Regulation*, *79*, 100772. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2020.100772>
- Taupenot, L. (2007). Analysis of Regulated Secretion Using PC12 Cells. *Current Protocols in Cell Biology*, *36*(1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1512s36>
- Taupenot, L., Harper, K. L., Mahapatra, N. R., Parmer, R. J., Mahata, S. K., & O'Connor, D. T. (2002). Identification of a novel sorting determinant for the regulated pathway in the secretory protein chromogranin A. *Journal of Cell Science*, *115*(24), 4827–4841. <https://doi.org/10.1242/jcs.00140>
- Taupenot, L., Harper, K. L., & O'Connor, D. T. (2003). The Chromogranin–Secretogranin Family. *New England Journal of Medicine*, *348*(12), 1134–1149. <https://doi.org/10.1056/NEJMra021405>
- The FANTOM Consortium, De Rie, D., Abugessaisa, I., Alam, T., Arner, E., Arner, P., Ashoor, H., Åström, G., Babina, M., Bertin, N., Burroughs, A. M., Carlisle, A. J., Daub, C. O., Detmar, M., Deviatiiarov, R., Fort, A., Gebhard, C., Goldowitz, D., Guhl, S., ... De Hoon, M. J. L. (2017). An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nature Biotechnology*, *35*(9), 872–878. <https://doi.org/10.1038/nbt.3947>
- Thompson, L. D. R. (2002). Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score (PASS) to Separate Benign From Malignant Neoplasms: A Clinicopathologic and Immunophenotypic Study of 100 Cases. *The American Journal of Surgical Pathology*, *26*(5), 551–566. <https://doi.org/10.1097/00000478-200205000-00002>
- Thouënnon, E., Pierre, A., Yon, L., & Anouar, Y. (2010). Expression of Trophic Peptides and

Their Receptors in Chromaffin Cells and Pheochromocytoma. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30(8), 1383–1389. <https://doi.org/10.1007/s10571-010-9594-9>

Timmers, H. J. L. M., Chen, C. C., Carrasquillo, J. A., Whatley, M., Ling, A., Havekes, B., Eisenhofer, G., Martiniova, L., Adams, K. T., & Pacak, K. (2009). Comparison of 18F-Fluoro-L-DOPA, 18F-Fluoro-Deoxyglucose, and 18F-Fluorodopamine PET and 123I-MIBG Scintigraphy in the Localization of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(12), 4757–4767. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1248>

Tischler, A. S. (1989). The Dispersed Neuroendocrine Cells: The Structure, Function, Regulation and Effects of Xenobiotics on this System. *Toxicologic Pathology*, 17(2), 307–316. <https://doi.org/10.1177/019262338901700207>

Tischler, A. S., & Greene, L. A. (1978). Morphologic and cytochemical properties of a clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 39(2), 77–89.

Tobaben, S., Thakur, P., Fernández-Chacón, R., Südhof, T. C., Rettig, J., & Stahl, B. (2001). A Trimeric Protein Complex Functions as a Synaptic Chaperone Machine. *Neuron*, 31(6), 987–999. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00427-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00427-5)

Tokar, T., Pastrello, C., Rossos, A. E. M., Abovsky, M., Hauschild, A.-C., Tsay, M., Lu, R., & Jurisica, I. (2018). mirDIP 4.1—Integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D360–D370. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1144>

Toledo, R. A., Qin, Y., Cheng, Z.-M., Gao, Q., Iwata, S., Silva, G. M., Prasad, M. L., Ocal, I. T., Rao, S., Aronin, N., Barontini, M., Bruder, J., Reddick, R. L., Chen, Y., Aguiar, R. C. T., & Dahia, P. L. M. (2016). Recurrent Mutations of Chromatin-Remodeling Genes and Kinase Receptors in Pheochromocytomas and Paragangliomas. *Clinical Cancer Research*, 22(9), 2301–2310. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1841>

tom Dieck, S., Sanmartí-Vila, L., Langnaese, K., Richter, K., Kindler, S., Soyke, A., Wex, H., Smalla, K. H., Kämpf, U., Fränzer, J. T., Stumm, M., Garner, C. C., & Gundelfinger, E. D. (1998). Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *The Journal of Cell Biology*, 142(2), 499–509. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.2.499>

Tong, A., Li, M., Cui, Y., Ma, X., Wang, H., & Li, Y. (2020). Temozolomide Is a Potential

Therapeutic Tool for Patients With Metastatic Pheochromocytoma/Paraganglioma-Case Report and Review of the Literature. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 61. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00061>

Tooze, S. A. (1998). Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1404(1–2), 231–244. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(98\)00059-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(98)00059-7)

Tooze, S. A., Flatmark, T., Tooze, J., & Huttner, W. B. (1991). Characterization of the immature secretory granule, an intermediate in granule biogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 115(6), 1491–1503. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.6.1491>

Trifaró, J. M., Rosé, S. D., & Marcu, M. G. (2000). Scinderin, a Ca<sup>2+</sup>-dependent actin filament severing protein that controls cortical actin network dynamics during secretion. *Neurochemical Research*, 25(1), 133–144. <https://doi.org/10.1023/a:1007503919265>

Tsang, V. H. M., Dwight, T., Benn, D. E., Meyer-Rochow, G. Y., Gill, A. J., Sywak, M., Sidhu, S., Veivers, D., Sue, C. M., Robinson, B. G., Clifton-Bligh, R. J., & Parker, N. R. (2014). Overexpression of miR-210 is associated with SDH-related pheochromocytomas, paragangliomas, and gastrointestinal stromal tumours. *Endocrine-Related Cancer*, 21(3), 415–426. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0519>

Urbé, S., Dittié, A. S., & Tooze, S. A. (1997). pH-dependent processing of secretogranin II by the endopeptidase PC2 in isolated immature secretory granules. *Biochemical Journal*, 321(1), 65–74. <https://doi.org/10.1042/bj3210065>

Urbé, S., Page, L. J., & Tooze, S. A. (1998). Homotypic Fusion of Immature Secretory Granules during Maturation in a Cell-free Assay. *The Journal of Cell Biology*, 143(7), 1831–1844. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.7.1831>

Van Der Harst, E., De Herder, W., De Krijger, R., Bruining, H., Bonjer, H., Lamberts, S., Van Den Meiracker, A., Stijnen, T., & Boomsma, F. (2002). The value of plasma markers for the clinical behaviour of pheochromocytomas. *European Journal of Endocrinology*, 85–94. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1470085>

Veit, M., Söllner, T. H., & Rothman, J. E. (1996). Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the t-SNARE SNAP-25. *FEBS Letters*, 385(1–2), 119–123. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00362-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00362-6)

- Vejnar, C. E., Blum, M., & Zdobnov, E. M. (2013). miRmap web: Comprehensive microRNA target prediction online. *Nucleic Acids Research*, *41*(W1), W165–W168. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt430>
- Verberne, A. J. M., Korim, W. S., Sabetghadam, A., & Llewellyn-Smith, I. J. (2016). Adrenaline: Insights into its metabolic roles in hypoglycaemia and diabetes: Adrenaline and glucose homeostasis. *British Journal of Pharmacology*, *173*(9), 1425–1437. <https://doi.org/10.1111/bph.13458>
- Verhage, M., & Sørensen, J. B. (2020). SNAREopathies: Diversity in Mechanisms and Symptoms. *Neuron*, *107*(1), 22–37. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.05.036>
- Vernon, M., Lambert, B., Meryet-Figuière, M., Brotin, E., Weiswald, L.-B., Paysant, H., Vigneron, N., Wambecke, A., Abeilard, E., Giffard, F., Louis, M.-H., Blanc-Fournier, C., Gauduchon, P., Poulain, L., & Denoyelle, C. (2020). Functional miRNA Screening Identifies Wide-ranging Antitumor Properties of miR-3622b-5p and Reveals a New Therapeutic Combination Strategy in Ovarian Tumor Organoids. *Molecular Cancer Therapeutics*, *19*(7), 1506–1519. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0510>
- Verstreken, P., Koh, T.-W., Schulze, K. L., Zhai, R. G., Hiesinger, P. R., Zhou, Y., Mehta, S. Q., Cao, Y., Roos, J., & Bellen, H. J. (2003). Synaptojanin Is Recruited by Endophilin to Promote Synaptic Vesicle Uncoating. *Neuron*, *40*(4), 733–748. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00644-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00644-5)
- Veys, C., Boulouard, F., Benmoussa, A., Jammes, M., Brotin, E., Rédini, F., Poulain, L., Gruchy, N., Denoyelle, C., Legendre, F., & Galera, P. (2023). MiR-4270 acts as a tumor suppressor by directly targeting Bcl-xL in human osteosarcoma cells. *Frontiers in Oncology*, *13*, 1220459. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1220459>
- Viskupic, E., Kvetnansky, R., Sabban, E. L., Fukuhara, K., Weise, V. K., Kopin, I. J., & Schwartz, J. P. (2002). Increase in Rat Adrenal Phenylethanolamine N-Methyltransferase mRNA Level Caused by Immobilization Stress Depends on Intact Pituitary—Adrenocortical Axis. *Journal of Neurochemistry*, *63*(3), 808–814. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63030808.x>
- Vousden, K. H., & Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, *137*(3), 413–431. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.037>
- Wachtel, H., Kennedy, E. H., Zaheer, S., Bartlett, E. K., Fishbein, L., Roses, R. E., Fraker, D.



- L., & Cohen, D. L. (2015). Preoperative Metyrosine Improves Cardiovascular Outcomes for Patients Undergoing Surgery for Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Annals of Surgical Oncology*, 22(S3), 646–654. <https://doi.org/10.1245/s10434-015-4862-z>
- Wang, H. M., Liao, Z. X., Komaki, R., Welsh, J. W., O'Reilly, M. S., Chang, J. Y., Zhuang, Y., Levy, L. B., Lu, C., & Gomez, D. R. (2013). Improved survival outcomes with the incidental use of beta-blockers among patients with non-small-cell lung cancer treated with definitive radiation therapy. *Annals of Oncology*, 24(5), 1312–1319. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds616>
- Wang, Y., & Jin, L. (2017). miRNA-145 is associated with spontaneous hypertension by targeting SLC7A1. *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5371>
- Wang, Y., Liu, X., Biederer, T., & Südhof, T. C. (2002). A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing: Implications for the genesis of synaptic active zones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), 14464–14469. <https://doi.org/10.1073/pnas.182532999>
- Watanabe, S., Rost, B. R., Camacho-Pérez, M., Davis, M. W., Söhl-Kielczynski, B., Rosenmund, C., & Jorgensen, E. M. (2013). Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature*, 504(7479), 242–247. <https://doi.org/10.1038/nature12809>
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., How Huang, K., Jen Lee, M., Galas, D. J., & Wang, K. (2010). The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clinical Chemistry*, 56(11), 1733–1741. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>
- Wegrzyn, J. L., Bark, S. J., Funkelstein, L., Mosier, C., Yap, A., Kazemi-Esfarjani, P., La Spada, A. R., Sigurdson, C., O'Connor, D. T., & Hook, V. (2010). Proteomics of Dense Core Secretory Vesicles Reveal Distinct Protein Categories for Secretion of Neuroeffectors for Cell–Cell Communication. *Journal of Proteome Research*, 9(10), 5002–5024. <https://doi.org/10.1021/pr1003104>
- Wei, C., Thatcher, E. J., Olena, A. F., Cha, D. J., Perdigoto, A. L., Marshall, A. F., Carter, B. D., Broadie, K., & Patton, J. G. (2013). miR-153 Regulates SNAP-25, Synaptic Transmission, and Neuronal Development. *PLoS ONE*, 8(2), e57080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057080>
- Wei, Z., Biswas, N., Wang, L., Courel, M., Zhang, K., Soler-Jover, A., Taupenot, L., &

- O'Connor, D. T. (2011). A Common Genetic Variant in the 3'-UTR of Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase *ATP6V0A1* Creates a Micro-RNA Motif to Alter Chromogranin A Processing and Hypertension Risk. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 4(4), 381–389. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.111.959767>
- Weingarten, T. N., Welch, T. L., Moore, T. L., Walters, G. F., Whipple, J. L., Cavalcante, A., Bancos, I., Young, W. F., Gruber, L. M., Shah, M. Z., McKenzie, T. J., Schroeder, D. R., & Sprung, J. (2017). Preoperative Levels of Catecholamines and Metanephrines and Intraoperative Hemodynamics of Patients Undergoing Pheochromocytoma and Paraganglioma Resection. *Urology*, 100, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2016.10.012>
- Welander, J., Łysiak, M., Brauckhoff, M., Brunaud, L., Söderkvist, P., & Gimm, O. (2018). Activating FGFR1 Mutations in Sporadic Pheochromocytomas. *World Journal of Surgery*, 42(2), 482–489. <https://doi.org/10.1007/s00268-017-4320-0>
- Wendler, F., Page, L., Urbé, S., & Tooze, S. A. (2001). Homotypic Fusion of Immature Secretory Granules During Maturation Requires Syntaxin 6. *Molecular Biology of the Cell*, 12(6), 1699–1709. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.6.1699>
- Westerink, R. H. S., & Ewing, A. G. (2008). The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiologica*, 192(2), 273–285. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01805.x>
- White, B. E., Rous, B., Chandrakumaran, K., Wong, K., Bouvier, C., Van Hemelrijck, M., George, G., Russell, B., Srirajaskanthan, R., & Ramage, J. K. (2022). Incidence and survival of neuroendocrine neoplasia in England 1995–2018: A retrospective, population-based study. *The Lancet Regional Health - Europe*, 23, 100510. <https://doi.org/10.1016/j.lanep.2022.100510>
- Wilczynska, A., & Bushell, M. (2015). The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death & Differentiation*, 22(1), 22–33. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.112>
- William Tank, A., & Lee Wong, D. (2014). Peripheral and Central Effects of Circulating Catecholamines. In R. Terjung (Ed.), *Comprehensive Physiology* (1st ed., pp. 1–15). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140007>
- Wilson, R. C., Tambe, A., Kidwell, M. A., Noland, C. L., Schneider, C. P., & Doudna, J. A. (2015). Dicer-TRBP Complex Formation Ensures Accurate Mammalian MicroRNA Biogenesis. *Molecular Cell*, 57(3), 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.030>
- Winkler, H. (1997). Membrane composition of adrenergic large and small dense cored vesicles

and of synaptic vesicles: Consequences for their biogenesis. *Neurochemical Research*, 22(8), 921–932. <https://doi.org/10.1023/a:1022410506476>

Winzeler, B., Challis, B. G., & Casey, R. T. (2021). Precision Medicine in Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Journal of Personalized Medicine*, 11(11), 1239. <https://doi.org/10.3390/jpm11111239>

Wong, N. W., Chen, Y., Chen, S., & Wang, X. (2018). *OncomiR*: An online resource for exploring pan-cancer microRNA dysregulation. *Bioinformatics*, 34(4), 713–715. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx627>

Wu, H., Ye, C., Ramirez, D., & Manjunath, N. (2009). Alternative Processing of Primary microRNA Transcripts by Drosha Generates 5' End Variation of Mature microRNA. *PLoS ONE*, 4(10), e7566. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007566>

Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. M. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: A systematic review. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>

Xie, M., Li, M., Vilborg, A., Lee, N., Shu, M.-D., Yartseva, V., Šestan, N., & Steitz, J. A. (2013). Mammalian 5'-Capped MicroRNA Precursors that Generate a Single MicroRNA. *Cell*, 155(7), 1568–1580. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.027>

Yan, M.-L., Zhang, S., Zhao, H.-M., Xia, S.-N., Jin, Z., Xu, Y., Yang, L., Qu, Y., Huang, S.-Y., Duan, M.-J., Mao, M., An, X.-B., Mishra, C., Zhang, X.-Y., Sun, L.-H., & Ai, J. (2020). MicroRNA-153 impairs presynaptic plasticity by blocking vesicle release following chronic brain hypoperfusion. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00551-8>

Yekta, S., Shih, I., & Bartel, D. P. (2004). MicroRNA-Directed Cleavage of *HOXB8* mRNA. *Science*, 304(5670), 594–596. <https://doi.org/10.1126/science.1097434>

Yeom, K.-H., Lee, Y., Han, J., Suh, M. R., & Kim, V. N. (2006). Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Research*, 34(16), 4622–4629. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl458>

Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 17(24), 3011–3016. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>

- Yoo, S. H. (2010). Secretory granules in inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling in the cytoplasm of neuroendocrine cells. *The FASEB Journal*, *24*(3), 653–664. <https://doi.org/10.1096/fj.09-132456>
- Yu, A., Li, M., Xing, C., Chen, D., Wang, C., Xiao, Q., Zhang, L., Pang, Y., Wang, Y., Zu, X., & Liu, L. (2020). A Comprehensive Analysis Identified the Key Differentially Expressed Circular Ribonucleic Acids and Methylation-Related Function in Pheochromocytomas and Paragangliomas. *Frontiers in Genetics*, *11*, 15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00015>
- Zeng, Y., & Cullen, B. R. (2003). Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA*, *9*(1), 112–123. <https://doi.org/10.1261/rna.2780503>
- Zeng, Y., Yi, R., & Cullen, B. R. (2005). Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *The EMBO Journal*, *24*(1), 138–148. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600491>
- Zhang, D., Ma, Q., Wang, Z., Zhang, M., Guo, K., Wang, F., & Wu, E. (2011). B2-adrenoceptor blockage induces G1/S phase arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells via Ras/Akt/NFκB pathway. *Molecular Cancer*, *10*(1), 146. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-146>
- Zhang, H., Kolb, F. A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., & Filipowicz, W. (2004). Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. *Cell*, *118*(1), 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.017>
- Zhang, L., Liao, Y., & Tang, L. (2019). MicroRNA-34 family: A potential tumor suppressor and therapeutic candidate in cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *38*(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1059-5>
- Zhang, P., Ren, J., Wan, J., Sun, R., & Li, Y. (2020). Circular RNA hsa\_circ\_0002052 promotes osteosarcoma via modulating miR-382/STX6 axis. *Human Cell*, *33*(3), 810–818. <https://doi.org/10.1007/s13577-020-00335-9>
- Zhang, S., Yan, M.-L., Yang, L., An, X.-B., Zhao, H.-M., Xia, S.-N., Jin, Z., Huang, S.-Y., Qu, Y., & Ai, J. (2020). MicroRNA-153 impairs hippocampal synaptic vesicle trafficking via downregulation of synapsin I in rats following chronic cerebral hypoperfusion. *Experimental Neurology*, *332*, 113389. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113389>
- Zhang, X., & Zeng, Y. (2010). The terminal loop region controls microRNA processing by Drosha and Dicer. *Nucleic Acids Research*, *38*(21), 7689–7697.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkq645>

Zhang, Z., Wu, Y., Wang, Z., Dunning, F. M., Rehfuss, J., Ramanan, D., Chapman, E. R., & Jackson, M. B. (2011). Release mode of large and small dense-core vesicles specified by different synaptotagmin isoforms in PC12 cells. *Molecular Biology of the Cell*, 22(13), 2324–2336. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-02-0159>

Zhao, M., Kim, P., Mitra, R., Zhao, J., & Zhao, Z. (2016). TSGene 2.0: An updated literature-based knowledgebase for tumor suppressor genes. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1023–D1031. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1268>

Zigmond, R. E., Schwarzschild, M. A., & Rittenhouse, A. R. (1989). ACUTE REGULATION OF TYROSINE HYDROXYLASE BY NERVE ACTIVITY AND BY NEUROTRANSMITTERS VIA PHOSPHORYLATION. *Annual Review of Neuroscience*, 12(1), 415–461. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.12.030189.002215>

Zuber, S. M., Kantorovich, V., & Pacak, K. (2011). Hypertension in Pheochromocytoma: Characteristics and Treatment. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 40(2), 295–311. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2011.02.002>

Zuckerman-Levin, N., Tiosano, D., Eisenhofer, G., Bornstein, S., & Hochberg, Z. (2001). The Importance of Adrenocortical Glucocorticoids for Adrenomedullary and Physiological Response to Stress: A Study in Isolated Glucocorticoid Deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(12), 5920–5924. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.12.8106>

# Rôle des microARNs dans le contrôle de l'hypersécrétion par les tumeurs neuroendocrines

## Résumé

L'homéostasie est un phénomène essentiel permettant à l'organisme de maintenir un fonctionnement stable en dépit de perturbations internes et externes. Ces modifications continues compensatoires des fonctions corporelles sont notamment préservées par le système neuroendocrinien qui ajuste la production d'hormones de l'organisme. Parmi les cellules neuroendocrines impliquées, les cellules chromaffines de la médullosurrénale sécrètent des catécholamines en réponse au stress et permettent une réponse dite de « fight or flight » nécessaire à une distribution ajustée de l'énergie de l'organisme, notamment par des modulations au niveau cardiovasculaire. Ces catécholamines sont sécrétées via un processus de sécrétion régulée par le calcium se concluant par l'exocytose, étape essentielle de la libération d'hormone dans la circulation sanguine. Le phéochromocytome (PCC), une tumeur neuroendocrine rare de la médullosurrénale, est caractérisé par une hypersécrétion de catécholamines à l'origine de répercussions délétères sur la présentation de la maladie mais également susceptible d'influencer son diagnostic, son pronostic ainsi que sa prise en charge. Les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents à cette dérégulation sont toutefois peu connus. Mes travaux de thèse démontrent que cette hypersécrétion du PCC ne résulte pas seulement d'un effet de masse tumorale mais qu'elle implique également un dysfonctionnement à l'échelle de la cellule individuelle. En effet, ces cellules présentent une augmentation de l'activité d'exocytose, associée à une surexpression globale des gènes impliqués dans ce processus tant au niveau transcriptionnel que protéique. Nous nous sommes interrogés alors sur les potentiels régulateurs de cette hypersécrétion hormonale en exploitant la piste des microARN, des acteurs essentiels de l'homéostasie cellulaire. Nous avons alors montré le rôle majeur joué par un groupe de 20 microARN inhibiteurs post-transcriptionnels de l'expression des gènes de l'exocytose. Leur sous-expression globale dans le PCC est associée à la surexpression des gènes de l'exocytose et ainsi à la suractivation de la sécrétion de catécholamines. Ces études constituent un point de départ solide vers une meilleure compréhension de la physiopathologie des PCC et des tumeurs neuroendocrines, principalement caractérisés par une hypersécrétion hormonale.

Mots clés : exocytose, microARN, phéochromocytome, sécrétion régulée par le calcium

## Summary

Homeostasis, a vital phenomenon, enables the body to maintain stable functioning even in the face of internal and external disturbances. The continual compensatory adjustments in bodily functions are primarily governed by the neuroendocrine system, which regulates the production of hormones within the body. Among the neuroendocrine cells involved, chromaffin cells of the adrenal medulla gland respond to stress by secreting catecholamines. This "fight or flight" response is critical for the balanced distribution of the body's energy, particularly through cardiovascular modulations. These catecholamines are released through a calcium-regulated secretion process, culminating in exocytosis, the final step in hormone release into the bloodstream. Pheochromocytoma (PCC), a rare neuroendocrine tumor of the adrenal medulla gland, is characterized by an overproduction of catecholamines, which has deleterious effects on disease presentation and potential implications for diagnosis, prognosis, and management. However, the underlying molecular and cellular mechanisms of this dysregulation are not well understood. We have demonstrated that the hypersecretion in PCC is not solely due to the tumor burden but also involves dysfunction at the individual cell level. These cells demonstrate increased exocytosis activity, associated with an overexpression of genes related to this process, both at the transcriptional and protein levels. To explore potential regulators of this hormonal hypersecretion, we investigated the role of microRNAs, which are essential post-transcriptional modulators of cellular homeostasis. Our studies have highlighted the significant role played by a group of 20 post-transcriptional inhibitors microRNAs in the expression of exocytosis-related genes. Their overall underexpression in PCC is associated with the overexpression of exocytosis-related genes and, consequently, the hyperactivation of catecholamine secretion. These studies represent a solid foundation for a better understanding of the pathophysiology of PCC and neuroendocrine tumors, which are primarily characterized by hormonal hypersecretion.

Keywords: exocytosis, microRNA, pheochromocytoma, calcium-regulated secretion