N° d'ordre NNT : 2017LYSE1079

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Biologie
Discipline : Cancérologie

Soutenue publiquement le 19/05/2017, par :
Patricia Freis

Interaction entre le stress du réticulum endoplasmique et la voie mTOR dans les néoplasmes neuroendocrines gastro-entéro-pancréatiques : vers une nouvelle option thérapeutique ?

Devant le jury composé de :

Buscail Louis, PU-PH, Hôpital Rangueil/CRCT	Rapporteur
Foufelle Fabienne, Dr, Centre de recherches des Cordeliers	Rapportrice
Mollereau Bertrand, Dr, ENS de Lyon	Examinateur
Scoazec Jean-Yves, PU-PH, IGR	Examinateur
Walter Thomas, PU-PH, HCL/UCBL1	Examinateur
Ferraro-Peyret Carole, MCU-PH, HCL/UCBL1	Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier le Docteur Fabienne Foufelle et le Professeur Louis Buscail pour avoir accepté d'examiner ce travail en tant que rapporteurs de mon jury de thèse et pour l'attention qu'ils porteront à ce travail.

Je remercie le Docteur Bertrand Mollereau, le Professeur Jean-Yves Scoazec et le Professeur Thomas Walter pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être membres de ce jury.

Je remercie le Docteur Carole Ferraro-Peyret, ma directrice de thèse, pour la confiance qu'elle m'a témoignée en acceptant de diriger mes travaux, il y a maintenant 4 ans et demi, quand j'ai fait le choix de suivre la filière Innovation Pharmaceutique et Recherche de l'internat en Pharmacie à Lyon. Merci pour votre soutien et votre engagement dans la construction de mon parcours professionnel scientifique, du Master2 à la thèse de Doctorat.

A Joëlle, toi qui étais réticente à l'arrivée d'étudiants pour travailler avec toi, j'espère t'avoir fait changer d'avis ! Merci de m'avoir transmis tes connaissances techniques à mon arrivée au laboratoire, pour ta constante bonne humeur et l'ambiance joyeuse que tu mets partout où tu passes. Enfin merci pour ton aide et ton travail durant ces 4 années qui ont finalement payé par la publication de nos résultats.

Je remercie le Docteur Serge Manié, pour m'avoir apporté son aide et son analyse pertinente de mes résultats, lors des réunions du mercredi matin. Merci pour la relecture de la partie Stress du réticulum de mon manuscrit.

Je remercie les membres de l'équipe Serge Manié, à savoir Audrey, Carmen, Cédric C, Cédric D, Sofiane et Virginie, pour d'une part leur accueil à mon arrivée dans l'équipe, et d'autre part leur aide technique, scientifique, mais aussi morale dans les moments plus compliqués des années de thèse. Merci pour votre soutien et pour les bons moments que l'on a passé ensemble !

J'ai également une pensée pour les anciens de Laennec, notamment Julien et Patrick, que je remercie chaleureusement pour tout ce qu'ils ont su m'apporter scientifiquement, car oui, on pouvait discuter sérieusement, mais aussi pour tous ces moments de détente partagés avec les stagiaires de M2 (Just Dance !).

Je remercie Alja, avec qui j'ai beaucoup partagé lors de notre année de M2. Je te souhaite beaucoup de courage pour terminer toi aussi ta thèse, et bonne chance pour la suite, en France ou ailleurs ?

Merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer dans l'équipe du Professeur Jean-Yves Scoazec et du Docteur Zhang, à la faculté de Laennec, et à celles que j'ai rencontrées dans l'équipe du Docteur Touffic Renno, suite à la restructuration des équipes du CRCL en 2015.

Je vais me répéter avec les remerciements de la thèse de Pharmacie, mais encore une fois, merci Maman et Papa, pour votre soutien et votre aide durant toutes ces années d'études (ça va faire 10 ans cette année que j'ai passé le bac !), et pour tous vos conseils.

Merci aussi aux Lorrains, Sophie, Pierre, Kévin, Guillaume, pour votre présence tout simplement tout au long de ces années, et pour tout ce qu'on a partagé (au collège, au lycée ou à la fac) et ce qu'on partagera encore, je l'espère !

Le petit chat Léo m'a soutenu durant les 3 ½ mois d'écriture de ma thèse, en dormant sur le bureau (et parfois sur le clavier). C'est une boule de poils anti-stress plutôt efficace.

Et pour terminer, merci Laurent, pour avoir supporté l'épreuve de la 2nde thèse (c'est sûr, c'est la dernière). Merci pour tes conseils et ton soutien, notamment durant cette dernière année plus compliquée que prévue. Merci pour tout.

Et maintenant, chers lecteurs, certains d'entre vous s'arrêteront ici, d'autres auront le courage de continuer, alors je vous en remercie et vous souhaite une bonne lecture.

TABLE DES MATIERES

Remerciements 3

Liste des abréviations 9

Liste des illustrations et tableaux 13

Introduction 15

Données bibliographiques 17

Première partie – Les néoplasmes neuroendocrines gastro-entéro-pancréatiques (NNE GEP) ... 19

1. Les cellules neuroendocrines 19

1.1. Définition 19

1.2. Fonctions 20

1.3. Origine embryologique 22

2. Les néoplasmes neuroendocrines gastro-entéro-pancréatiques 24

2.1. Epidémiologie 24

2.2. Caractéristiques 24

2.3. Classification 25

2.4. Syndrome de prédisposition génétique 28

2.4.1. Les néoplasies endocriniennes multiples 28

2.4.2. Le syndrome de Von Hippel-Lindau 29

2.4.3. La neurofibromatose de type 1 29

2.5. Autres altérations génétiques mises en évidence dans les NNE GEP 30

2.6. Diagnostic 32

2.6.1. Présentation clinique des TNE GEP 32

2.6.2. Présentation clinique des CNE GEP 33

2.6.3. Diagnostic biologique 33

2.6.4. Diagnostic anatomopathologique 34

2.6.5. Examens morphologiques initiaux 35

2.7. Pronostic 35
2.8. Traitement 37
2.8.1. Traitement des symptômes liés aux sécrétions tumorales 40
Les analogues de la somatostatine 40
L'interféron-α 42
2.8.2. Chirurgie 42
2.8.3. Chimiothérapie 43
2.8.4. Autres traitements 44
Traitement des métastases hépatiques 44
Radiothérapie métabolique 45
Immunothérapie 45
2.8.5. Thérapies ciblées 47
Thérapies ciblées visant l'angiogenèse 47
Thérapies ciblant la voie mTOR 50
Deuxième partie – Stress du réticulum endoplasmique et cancer 63
1. Le stress du réticulum endoplasmique et la réponse UPR 63
1.1. Généralités sur le réticulum endoplasmique 63
1.2. Le stress du réticulum endoplasmique 64
1.2.1. Les inducteurs du SRE 64
1.2.2. Les 3 voies de l'UPR 66
La voie PERK 68
La voie IRE1 69
La voie ATF6 70
Interaction entre les 3 voies de l'UPR 71
2. L'implication des voies de l'UPR dans le cancer 71
2.1. Altération du profil d'expression des voies de l'UPR dans le cancer 72
2.2. Les facteurs de SRE dans le cancer 73

2.3. Dualité de la réponse UPR dans l'oncogenèse 75
2.3.1. Dualité de la voie PERK 75
2.3.2. Dualité de la voie IRE1 76
2.3.3. Dualité de la voie ATF6 77
3. L'UPR dans les NNE GEP 79
4. L'UPR comme facteur pronostique dans le cancer 80
5. L'UPR comme cible thérapeutique anti-cancéreuse 83
6. La relation entre l'UPR et la voie mTOR 87
6.1. mTORC1 et UPR 87
6.2. mTORC2 et UPR 89
Objectifs du travail 91
Résultats 93
Résultats complémentaires 115
1. L'UPR peut-il être une nouvelle cible thérapeutique dans la lutte contre les NNE GI ? 117
1.1. Les modulateurs de l'UPR ont-ils un impact sur la viabilité de cellules de NNE GI ? 117
1.2. La modulation de la réponse UPR va-t-elle modifier le développement tumoral ? 124
1.2.1. Présentation du modèle 124
1.2.2. Résultats 126
Existe-t-il un SRE au sein des nodules intrahépatiques ? 126
Quel est l'impact des modulateurs de l'UPR sur le développement des nodules intrahépatiques ? 128
2. L'UPR contrôle-t-il la voie mTORC1 dans les cellules de NNE GI ? 131
3. Quel est le rôle de la voie PERK dans le développement tumoral et peut-on la cibler ? 132
3.1. L'inhibition de la voie mTOR et de la voie PERK est-elle bénéfique *in vivo* ? 132
3.2. Confirme-t-on l'effet pro-survie de la voie PERK ? 135
3.2.1. Inhiber PERK grâce à une seconde méthode non pharmacologique entraine-t-il une diminution de la viabilité cellulaire ? 135

Présentation de la méthode CRIPSR-Cas9 135
Résultats 137
Discussion et perspectives 139
Les facteurs de SRE dans les NNE GI 141
L'UPR dans les NNE GI et intérêt de la voie PERK 142
L'UPR comme nouvelle cible dans le traitement des NNE GI 145
L'UPR comme nouveau moyen de résistance aux thérapies ciblant mTOR 147
Références bibliographiques 153
Annexe 187

LISTE DES ABREVIATIONS

4-PBA	Acide 4-phenobutyrique
4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
5-FU	5-fluorouracile
ACTH	Adrenocorticotropic hormone
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AMPK	AMP-activated protein kinase
APUD	Amine precursor uptake and decarboxylation
ASAT	Aspartate aminotransférase
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF4	Activating trasncription factor 4
ATF6	Activating transcription factor-6 protein
ATRX	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BiP	Binding immunoglobulin protein
CHOP	C/EBP homologous protein
DAXX	Death-domain associated protein
EGF	Epidermal growth factor
eIF2α	Eukaryotic translation initiation factor 2α
ENETS	European neuroendocrine tumor society
ERAD	Endoplasmic reticulum-associated protein degradation
ERSE	ER stress-reponse element
FDA	Food and drugs administration
Flt3	FMS-like tyrosine kinase-3
GADD34	Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34
GCN2	Gene control non-derepressible-2
GI	Gastro-intestinal
GIP	Gastric inhibitiory peptide
GLP	Glucagon-like peptide
GLUT1	Glucose transporter 1
GRB10	Growth factor receptor-bound protein 10
Grp78	Glucose-Regulated Protein 78kDa
HIF	Hypoxia inducible factors
HPF	High power field
HRI	Heme-regulated inhibitor
IGF	Insulin-like growth factor
IFN-α	Interféron-α
IRE1	Inositol requiring enzyme 1

IRM	Imagerie par résonance magnétique
IRS1	Insulin receptor substrate 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LDH	Lactate déshydrogénase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	= MAPKK, Mitogen-activated protein kinase kinase
MGMT	Methylguanine-DNA-methyltransferase
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
N-CAM	Neural cell adhesion molecule
NEM	Néoplasies endocriniennes multiples
NF1	Neurofibromatose de type 1
NRF2	NF-E2-related factor 2
NSE	Neuron-specific enolase
NNE GEP	Néoplasmes neuroendocrines gastroentéropancréatiques
PD-1	Programmed death 1
PD-L1	Programmed death ligand-1
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDI	Protein disulfide isomerase
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PERK	Protein kinase R-like ER kinase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase related protein kinases
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-phosphate
PIP3	phosphatidylinositol-3,4,5-phosphate
PP1	Sérine/thréonine protéine phosphatase 1
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
PTHrp	Parathyroid hormone-related protein
RB	Rétinoblastome
RE	Réticulum endoplasmique
RIDD	IRE1-dependent decay of mRNA
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results Program
SRE	Stress du réticulum endoplasmique
SRS	Scintigraphie des récepteurs de la somatostatine
SSTR	Somatostatin receptor
TDM	Tomodensitométrie
TGFα	Transforming growth factors α
TNE GEP	Tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
TNM	Tumor-Nodes-Metastasis

TP53	Tumor protein 53
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
TSC	Tuberous sclerosis complex
UICC	Union for international cancer control
UPR	Unfolded protein response
UPRE	Unfolded protein response element
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	von Hippel-Lindau
XBP1	X-box binding protein 1

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

Figure 1 : Localisation anatomique des cellules et organes neuroendocrines..... 18

Figure 2 : Schéma représentatif des précurseurs et facteurs de transcription pour la différenciation des cellules neuroendocrines du tube digestif. D'après Schonhoff, Giel-Moloney, et Leiter 2004. 23

Figure 3 : Algorithme 1 : Prise en charge d'une TNE métastatique du tube digestif. Adapté de (« Thésaurus National de Cancérologie Digestive » 2016). 38

Figure 4 : Algorithme 2 : Traitement des TNE métastatiques bien différenciées, progressives et non résécables du tude digestif. Adapté de (« Thésaurus National de Cancérologie Digestive » 2016). 39

Figure 5 : Les complexes mTORC1 et mTORC2 et leurs sous-unités. 51

Figure 6 : Schéma des voies de signalisation mTORC1 et mTORC2 dans les cellules de mammifères. 52

Figure 7 : Voies de signalisation mTORC1 et mTORC2, leurs régulateurs majeurs, leurs cibles et fonctions cellulaires. 53

Figure 8 : Représentation schématique des effets d'inhibiteurs de mTOR sur la voie mTOR. 60

Figure 9 : Représentation schématique des 3 protéines de l'UPR : IRE1, PERK et ATF6. 67

Figure 10 : Représentation schématique des 3 voies de l'UPR : PERK, IRE1 et ATF6. 67

Figure 11 : Taux de mutations des protéines ATF6, IRE1 et PERK en fonction de la localisation tumorale.... 72

Figure 12 : Evaluation de l'état des voies de l'UPR lors de traitements avec différents modulateurs de l'UPR dans les cellules STC-1. 119

Figure 13 : Impact des traitements GSK2656157, arctigénine et salubrinal sur la viabilité des cellules STC-1, soumises ou non à différentes conditions de SRE. 120

Figure 15 : Impact du traitement 4-PBA sur la viabilité des cellules STC-1, soumises ou non à un SRE. 122

Figure 14 : Impact du traitement bortezomib sur la viabilité des cellules STC-1. 122

Figure 16 : Schéma du modèle de dissémination métastatique de TNE dans des souris athymiques. 125

Figure 17 : Coupe histologique de foie de souris non traitée montrant les nodules intrahépatiques de cellules STC-1. Grossissement x400 125

Figure 18 : Marquage GLUT1 et BiP sur coupe histologique de foie de souris xénogreffées avec les cellules STC-1. 127

Figure 19 : Impact des modulateurs de l'UPR sur le développement des nodules intrahépatiques après injection intrasplénique de cellules STC-1. 129

Figure 20 : Effet de la molécule 4-PBA sur un des effecteurs de la voie mTOR p70S6K1. 131

Figure 21 : Impact de l'association d'un inhibiteur de mTOR RAD001 et d'un inhibiteur de PERK GSK2656157 sur le développement des nodules intrahépatiques après injection intrasplénique de cellules STC-1..... 133

Figure 22 : Schéma du plasmide lentiCRISPRv2 (#52961, Addgene). 136

Figure 23 : Evaluation de l'inhibition de la voie PERK dans des cellules STC-1 PERK+/+ et PERK-/-. 136

Figure 24 : Impact de l'inhibition de PERK sur la viabilité des cellules STC-1 en condition de SRE..... 138

Figure 25 : Impact de l'inhibition de PERK sur la viabilité des cellules STC-1 en présence de rapamycine avec ou sans condition de SRE. 138

Figure 26 : Schéma récapitulatif de l'activation de l'UPR et de la voie mTOR dans les cellules des NNE GI. 148

Tableau 1 : Les hormones sécrétées par les cellules neuroendocrines du tube digestif. 21

Tableau 2 : Classification anatomopathologique OMS 2010 des NNE. 26

Tableau 3 : Classification TNM de l'UICC, version 2009 (Sobin et al. 2010). 27

Tableau 4 : Gènes impliqués dans le tumorigenèse neuroendocrine. Adaptée de Crona, EJE, 2016. 31

Tableau 5 : Etudes cliniques évaluant les marqueurs de l'UPR comme facteur pronostique de survie dans différents types de cancer. 81

Tableau 6 : Molécules ciblant l'UPR et phases de développement clinique. 86

Tableau 7 : Récapitulatif de l'effet des modulateurs de l'UPR sur les protéines de l'UPR et sur la viabilité cellulaire. 123

Tableau 8 : Modulateurs de l'UPR administrés aux souris, posologies et modes d'administration. 125

INTRODUCTION

Les néoplasmes neuroendocrines gastro-entéro-pancréatiques, ou NNE GEP, représentent un groupe de tumeurs très hétérogènes, se développant à partir des cellules neuroendocrines de l'organisme. Leurs caractéristiques morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles rappellent celles des cellules neuroendocrines. Certaines de ces tumeurs sont donc capables de synthétiser et sécréter des peptides et des hormones.

Ce sont des tumeurs rares dont l'incidence est estimée entre 2 et 5 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes (Yao, Hassan, et al. 2008). Du fait de leur grande hétérogénéité, on retrouve parmi les NNE GEP des tumeurs indolentes, à développement lent, et au contraire des tumeurs très agressives et à développement rapide, pour lesquelles les chances de survie sont très faibles malgré les traitements.

L'arsenal thérapeutique disponible aujourd'hui pour les NNE GEP reste faible, même s'il s'est étoffé au cours de ces 10 dernières années, avec l'arrivée des thérapies ciblées. Deux molécules ont démontré leur efficacité sur la survie sans progression des NNE pancréatiques : l'inhibiteur de mTOR (mechanistic target of rapamycin) évérolimus (Yao et al. 2011) et l'inhibiteur de tyrosine-kinase sunitinib (Raymond et al. 2011). Cependant ces traitements présentent des résistances qui conditionnent leur efficacité. Il n'existe actuellement aucun biomarqueur permettant de sélectionner les patients répondeurs à ces traitements ou d'anticiper le développement de résistance.

L'équipe que j'ai rejointe en 2012 s'intéressait à la réponse des cellules de NNE GEP aux inhibiteurs de mTOR pour comprendre les mécanismes de résistances à ces thérapies, dans le but de les contourner. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au stress du réticulum endoplasmique (SRE) et à l' « unfolded protein response » (UPR) engendrée par le SRE. Ce grand mécanisme de régulation du stress cellulaire est impliqué dans la survie et la mort. En effet, le paradoxe de l'UPR repose sur le fait qu'il peut aussi bien favoriser la survie cellulaire que lui nuire lorsque l'intensité ou la durée du SRE dépassent les capacités d'adaptation de la cellule. De nombreuses études ont démontré l'activation du SRE et de l'UPR dans les cellules cancéreuses, principalement du fait de leur forte prolifération, et de stress environnementaux comme la

déplétion en nutriments ou l'hypoxie consécutives à l'insuffisante vascularisation tumorale. De plus, plusieurs molécules sont aujourd'hui en développement afin de cibler l'UPR dans le cancer.

Ce manuscrit présente mes travaux qui montrent l'intérêt à cibler l'UPR dans le traitement de NNE GEP. Nous suggérons également l'existence d'une voie de résistance impliquant l'UPR suite aux traitements par inhibiteurs de mTOR.

Ce manuscrit est divisé en une première partie faisant état des connaissances actuelles sur les NNE GEP et leurs traitements ainsi que sur le SRE et l'UPR dans le cancer, puis une deuxième partie « Résultats » regroupant mes travaux publiés et non publiées. Il se termine par une troisième partie « Discussion et perspectives ».

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

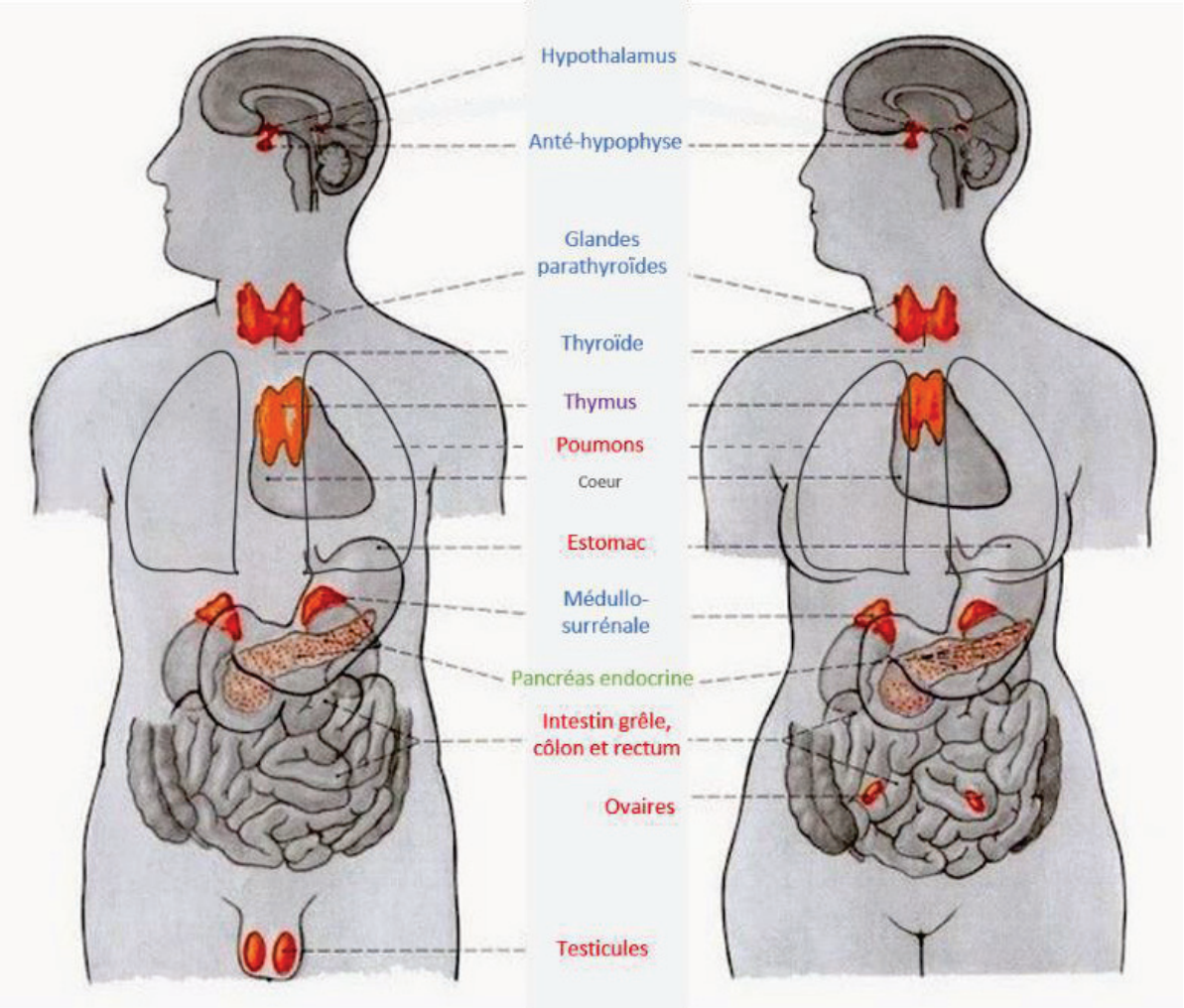


Figure 1 : Localisation anatomique des cellules et organes neuroendocrines.

Les organes neuroendocrines sont en bleu, les organes partiellement neuroendocrines en vert et les organes abritant le système endocrinien diffus en rouge. Le thymus (violet) n'est pas une glande neuroendocrine, mais des cellules neuroendocrines peuvent y être dispersées.

PREMIERE PARTIE – LES NEOPLASMES NEUROENDOCRINES GASTRO-ENTERO-PANCREATIQUES (NNE GEP)

1. Les cellules neuroendocrines

1.1. Définition

Le terme neuroendocrine se réfère aux propriétés sécrétoires des cellules, et non pas à leur siège ou origine embryologique. Les cellules neuroendocrines sont caractérisées par l'expression de marqueurs protéiques endocrines, comme la chromogranine A et neuroendocrines comme la synaptophysine.

Les cellules neuroendocrines forment soit des organes ou des parties d'organes, comme la thyroïde, l'hypothalamus, l'anté-hypophyse, la médullo-surrénale et les glandes parathyroïdes (en bleu Figure 1), ou elles peuvent se regrouper en amas cellulaires individualisés à l'intérieur d'un organe. C'est le cas du pancréas où elles constituent le pancréas endocrine (en vert Figure 1). Elles peuvent former un réseau de cellules dispersées à l'intérieur d'un organe, comme c'est le cas dans le tube digestif, le poumon ou l'appareil génital. Ce réseau est appelé système endocrinien diffus (en rouge Figure 1). Enfin, on retrouve des cellules neuroendocrines dans des glandes qui ne sont pas neuroendocrines, comme le thymus (en violet Figure 1), ou dispersées dans les tissus (arbre urinaire, glande mammaire) (Scoazec 2005; Lewis 1996).

Les cellules neuroendocrines se caractérisent par la présence de vésicules de sécrétion, ou grains de sécrétion, dont le contenu est libéré dans le milieu extracellulaire par un processus d'exocytose, suite à différents facteurs stimulant la sécrétion (Tableau 1). Ces grains constituent le stock intracellulaire d'hormones, prêt à être mobilisées en réponse à un besoin. Suite à leur synthèse dans le réticulum endoplasmique et à leur modification et maturation dans l'appareil de Golgi, les hormones sont stockées dans les grains de sécrétion où elles pourront finir leur maturation grâce à l'équipement enzymatique et moléculaire contenu dans ces grains. Ils contiennent notamment des enzymes comme les convertases PC1, 2 et 3, qui permettent à l'hormone inactive de devenir active. Les chromogranines A, B et C sont des constituants spécifiques des grains de sécrétion, qui jouent un rôle essentiel dans la création, la maturation et l'exocytose des grains de sécrétion (S. A. Feldman et Eiden 2003; T. Kim et al. 2005). La chromogranine A est libérée avec les hormones dans le milieu extracellulaire et elle est considérée comme un marqueur endocrine, dosé

dans le sérum humain ou détecté par immunohistochimie afin de caractériser les cellules lors d'une biopsie par exemple. Les vésicules neurosécrétoires caractérisent également les cellules neuroendocrines, sans leur être spécifiques. En effet, ce sont les homologues des vésicules présynaptiques des neurones, et parmi leurs constituants, on retrouve la synaptophysine, la synaptotagmine et la synaptobrévine (Wiedenmann et Huttner 1989). Ce sont des marqueurs dit neuroendocrines, car communs aux cellules endocrines et nerveuses. Les marqueurs neuroendocrines comprennent également les marqueurs cytosoliques telles que la NSE (neuron-specific enolase) ou la protéine PGP9.5 et les marqueurs membranaires, comme la protéine N-CAM (neural cell adhesion molecule).

1.2. Fonctions

La fonction principale des cellules neuroendocrines est de synthétiser et sécréter un ou plusieurs peptides ou hormones, qui vont induire ou réguler une fonction métabolique ou physiologique en agissant sur une ou plusieurs cibles. Les hormones se distinguent des autres médiateurs chimiques de l'organisme par leur capacité à exercer un rétrocontrôle négatif sur leur propre synthèse à la suite de l'action biologique exercée sur la cellule cible.

Au niveau gastrique et intestinal, une quinzaine de types cellulaires sécrétant une trentaine d'hormones agissant soit localement soit par voie sanguine ont été découverts. Les cellules neuroendocrines du tube digestif vont sécréter par exemple la cholécystokinine, la sérotonine, la somatostatine, la sécrétine, la gastrine (Tableau 1).

Le pancréas endocrine, dans lequel les cellules neuroendocrines sont regroupées sous forme d'îlots de Langerhans, sécrète l'insuline par les cellules β, le glucagon par les cellules α, la somatostatine par les cellules δ, le polypeptide pancréatique par les cellules PP, et la ghréline par les cellules ε.

Tableau 1 : Les hormones sécrétées par les cellules neuroendocrines du tube digestif.

Organe	Type cellulaire	Hormones	Facteurs régulant la sécrétion
Estomac	Enterochromaffin-like	Histamine	Hormones, gastrine, facteurs neuronaux
	X	Amyline	Non défini
Estomac et duodénum	G	Gastrine	Acides aminés, facteurs neuronaux et acidité
Duodénum	I	Chelocystokinine, gastrine, …	Lipides et facteurs neuronaux
	Motiline	Motiline	Facteurs neuronaux
	S	Sécrétine	Acidité
Duodénum et jéjunum	K	Polypeptide gastrique inhibiteur	Nutriments et hormones
Tube digestif	D	Somatostatine	Hormones, facteurs neuronaux et acidité
	Entérochromaffine	Sérotonine, substance P, guanyline, mélatonine	Hormones, facteurs neuronaux
	Gr	Ghréline	Hormones
	VIP	VIP (vaso-active intestinal polypeptide)	Facteurs neuronaux
Intestin grêle	L	Glucagon-like peptide, peptide YY, neuropeptide Y	Glucose et hormones
	N	Neurotensine	Lipides

1.3. Origine embryologique

L'origine embryologique des cellules neuroendocrines présentent dans l'hypophyse est bien connue : l'anté-hypophyse se forme à partir d'un bourgeon dérivant du pharynx et qui fusionne avec l'ébauche de la post-hypophyse, qui elle dérive du plancher cérébral (Dorton 2000). De même, les cellules neuroendocrines des glandes parathyroïdes dérivent des poches branchiales.

Au contraire, l'origine embryologique du système endocrinien diffus a longtemps été discutée. Il a longtemps été admis que ces cellules dérivaient de précurseurs migrant de la crête neurale vers leur localisation définitive (Farlie, McKeown, et Newgreen 2004). Les cellules neuroendocrines disséminées dans les tissus et aux propriétés fonctionnelles communes étaient regroupées dans un système commun, appelé APUD (amine precursor uptake and decarboxylation). Depuis, des études expérimentales ont pu montrer que certaines cellules neuroendocrines dérivaient effectivement de la crête neurale, comme les cellules de la médullo-surrénale, des para-ganglions sympathiques, ou les cellules para-folliculaires de la thyroïde, mais que la majorité des cellules du système endocrinien diffus se formaient *in situ* à partir d'une cellule souche, identique à celle qui permet la différenciation des autres types de cellules épithéliales composant l'organe où elles se développent (Montuenga et al. 2003). L'intestin embryonnaire comporte trois segments distincts (antérieur, moyen et postérieur) et chacun de ces segments est doté d'un compartiment de cellules souches d'où dérivent les cellules épithéliales, les cellules exocrines et les cellules neuroendocrines. Les cellules neuroendocrines du tube digestif dérivent donc d'un précurseur spécifique pour chacun des trois segments (Schonhoff, Giel-Moloney, et Leiter 2004).

La différenciation en cellules neuroendocrines à partir des précurseurs implique des facteurs de transcription qui diffèrent selon l'organe considéré, mais elle se déroule selon un schéma général identique. Tout d'abord, un précurseur commun à l'ensemble des cellules neuroendocrines de l'organe considéré émerge en réponse à un facteur de transcription spécifique, comme la neurogénine 3 pour le tube digestif et le pancréas endocrine (Gradwohl et al. 2000; S. Wang et al. 2009), ou pit-1 pour l'anté-hypophyse (Savage et al. 2003). A partir de ce précurseur commun émergent de nouveaux précurseurs des différentes lignées neuroendocrines de l'organe, conditionnées par l'activation séquentielle de plusieurs facteurs de transcription successifs (BETA2, Pax4, Pax6). Enfin, les cellules neuroendocrines de chacune des lignées se différencient, toujours sous la dépendance d'un ou plusieurs facteurs de transcription (Figure 2) (Schonhoff, Giel-Moloney, et Leiter 2004; Scoazec 2005).

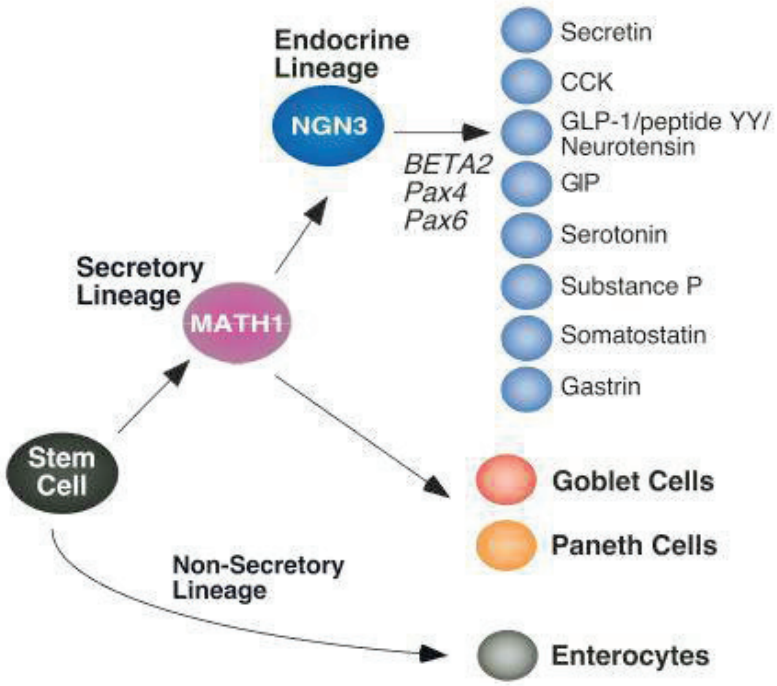


Figure 2 : Schéma représentatif des précurseurs et facteurs de transcription pour la différenciation des cellules neuroendocrines du tube digestif. D'après Schonhoff, Giel-Moloney, et Leiter 2004.

2. Les néoplasmes neuroendocrines gastro-entéro-pancréatiques

2.1. Epidémiologie

Les NNE GEP sont des tumeurs relativement rares, représentant environ 0,5% des cancers, mais leur incidence a augmenté de manière constante au cours des 40 dernières années (Yao, Hassan, et al. 2008). Une revue de la littérature a estimé une augmentation de l'incidence des NNE GEP de 3,6 fois aux Etats-Unis et entre 3,8 et 4,8 fois en Europe entre 1973 et 2007 (Fraenkel et al. 2014). Néanmoins, cette augmentation peut être le reflet d'une amélioration des techniques d'imagerie endoscopique et radiologiques, ou d'un changement de méthode dans l'enregistrement des cas au cours des années.

L'incidence des NNE GEP est nettement plus importante chez les Américains d'origine africaine que chez les Caucasiens. Les localisations tumorales au niveau de l'intestin grêle sont plus fréquentes chez les Caucasiens (Hauso et al. 2008), alors que les Afro-Américains, Africains, les populations asiatiques et des îles du Pacifique développent plus de NEN rectaux (Yao, Hassan, et al. 2008; Ito et al. 2010).

L'âge médian au diagnostic est de 63 ans, avec un pic d'incidence à 80 ans aux Etats-Unis (Lawrence et al. 2011). En France, l'âge moyen au diagnostic se situe autour de 67 ans chez l'homme et 65 ans chez la femme (Lepage et al. 2004). Les NNE GEP sont rares avant l'âge de 40 ans pour les deux sexes, puis leur incidence augmente plus rapidement chez l'homme que chez la femme (Lepage et al. 2004).

2.2. Caractéristiques

Les NNE GEP sont donc des tumeurs très hétérogènes d'origine épithéliale, qui expriment des marqueurs endocrines (chromogranine A) et neuroendocrines (synaptophysine). Les caractéristiques morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles des cellules neuroendocrines normales peuvent être présentes chez les NNE GEP. Néanmoins, elles se caractérisent par une grande hétérogénéité au niveau structural, fonctionnel, de leur localisation et de leur évolution (Scoazec 2005).

Une étude conduite par trois centres nationaux de cancérologie sur treize mois indique que les principales localisations des tumeurs primitives de NNE sont l'intestin grêle et le colon (43%). Ils sont suivis par le pancréas (32%), un primitif de localisation inconnue (11%), l'estomac (5%), une

origine non digestive (4%), l'appendice (3%), le rectum ou l'anus (2%) et enfin de l'œsophage (0,4%) (n=668 patients) (Lombard-Bohas et al. 2009).

La présence de métastases au diagnostic est très fréquente. En effet, plus de 70% des patients présentent une métastase au diagnostic, hépatique dans 60% des cas. Les autres localisations secondaires les plus fréquentes sont les ganglions lymphatiques à distance (22%), le péritoine (18%), les os (6%), les poumons (5%) et les ovaires (4%) (Lombard-Bohas et al. 2009).

La synthèse et la sécrétion d'une ou plusieurs hormones ne constituent pas des caractères indispensables aux NNE. Lorsque leur développement est associé à un syndrome clinique secondaire à une hypersécrétion d'hormones, les NNE sont qualifiés de tumeurs fonctionnelles.

Du fait de leur grande hétérogénéité, le profil évolutif est très variable selon le type de NNE, ce qui complique la prise en charge clinique et thérapeutique des patients. Afin de faciliter le diagnostic et d'améliorer cette prise en charge, différentes classifications ont été établies.

2.3. Classification

En 2000, l'organisation mondiale de la santé (OMS) fait apparaître les NNE GEP dans sa classification (Solcia et al. 2000). Celle-ci sera actualisée une première fois en 2004 (DeLellis et al. 2004) puis en 2010 (Rindi, Petrone, et Inzani 2014). La classification OMS 2010 distingue trois catégories de NNE GEP : les tumeurs neuroendocrines (TNE) de grade 1, les TNE de grade 2 et les carcinomes neuroendocrines (CNE) à petites ou grandes cellules (Tableau 2).

Cette classification se base sur la morphologie cellulaire (le degré de différenciation) et sur le grade, défini par l'index de prolifération (Ki-67) et l'index mitotique. L'index Ki-67 est évalué par comptage du nombre de cellules tumorales dont le noyau est marqué par l'anticorps dirigé contre l'antigène Ki-67 d'une protéine nucléaire, dans les cellules en phase G1, S, G2 et M. L'index mitotique permet d'estimer le nombre de mitoses au sein de la prolifération tumorale, à partir d'une coupe tissulaire, dans dix champs au fort grossissement (High Power Field, HPF) et pour une surface déterminée. Le grade tumoral a été repris à l'identique à partir du grade défini par l'ENETS (European NeuroEndocrine Tumor Society) en 2006.

Tableau 2 : Classification anatomopathologique OMS 2010 des NNE.

	Morphologie (différenciation)	Grade G1-G3 Ki-67 (%)*	Index mitotique (pour 10 HPF)	Abréviation
Tumeur neuroendocrine Grade 1	Bien différenciée	G1 (≤2)	<2	TNE G1
Tumeur neuroendocrine Grade 2	Bien différenciée	G2 (3-20)	2-20	TNE G2
Carcinome neuroendocrine G3	Peu différenciée (petites ou grandes cellules)	G3 (>20)	>20	CNE

*** Anticorps MiB1 (Immunotech ®) ; % sur 500 à 2 000 cellules tumorales dans les zones de plus haute densité de cellules marquées.**

HPF : High Power Field ou champs au fort grossissement

Les NNE GEP sont aussi classées selon la classification TNM (Tumor-Nodes-Metastasis). Deux classifications TNM sont à ce jour disponibles : la première proposée par l'ENETS, utilisée depuis 2006 (Rindi et al. 2006; Rindi et al. 2007), la seconde proposée par l'UICC (Union for International Cancer Control), publiée en 2009 (Sobin et al. 2010). La classification TNM UICC est la classification actuellement reconnue internationalement (Tableau 3).

Tableau 3 : Classification TNM de l'UICC, version 2009 (Sobin et al. 2010).

	Estomac	Intestin grêle	Pancréas	Appendice	Côlon-rectum
TX	Tumeur non évaluable				
T0	Pas de tumeur identifiable				
Tis	T<0,5mm	NA	Carcinome *in situ*	NA	NA
T1	Lamina propria ou sous muqueuse envahie et T ≤ 1 cm	Muqueuse ou sous-muqueuse envahie et T ≤ 1 cm	Envahissement limité au pancréas et T ≤ 2 cm	T ≤ 2 cm	Muqueuse ou sous-muqueuse envahie et T1a < 1 cm, T1b = 1-2cm
T2	Musculeuse ou sous-séreuse envahie ou T > 1 cm	Musculeuse envahie ou T > 1 cm	Envahissement limité au pancréas et T > 2 cm	Caecum envahi ou T > 2-4 cm	Musculeuse envahie ou T > 2 cm
T3	Séreuse envahie	Pancréas ou rétropéritoine ou sous-séreuse envahi	T dépassant le pancréas sans envahir l'axe cœliaque ni l'artère mésentérique supérieure	Iléon envahi ou T > 4 cm	Sous-séreuse ou graisse péricolique/rectale envahi
T4	Organes adjacents envahis	Péritoine ou organes adjacents envahis	Axe cœliaque ou artère mésentérique supérieures envahis	Péritoine ou organes adjacents envahis	Péritoine ou organes adjacents envahis
NX	Statut non évaluable				
N0	Absence de métastase ganglionnaire				
N1	Présence de métastases ganglionnaires				
MX	Statut non évaluable				
M0	Absence de métastase à distance				
M1	Présence de métastases à distance				

Note : T, Tumeur primaire ; N, ganglions lymphatiques régionaux ; M, métastases à distance

2.4. Syndrome de prédisposition génétique

La majorité des NNE GEP sont d'origine sporadique. Néanmoins, environ 20% des NNE apparaissent suite à un syndrome de prédisposition génétique (Crona et Skogseid 2016). A ce jour, dix syndromes génétiques de NNE sont connus, dont les plus répandus sont les néoplasies endocriniennes multiples de type 1 (NEM1) et de type 2 (NEM2), le syndrome de Von Hippel-Lindau et la neurofibromatose de type 1.

2.4.1. Les néoplasies endocriniennes multiples

La néoplasie endocrinienne multiple de type 1 (NEM1, ou syndrome de Wermer) est une maladie à transmission autosomique dominante où le patient peut développer une tumeur neuroendocrine de l'hypophyse antérieure dans 20 à 40% des cas, des parathyroïdes dans 95% des cas, ou duodéno-pancréatiques dans 40 à 80% des cas (Carling 2005; Brandi et al. 2001). Les patients ont généralement de multiples lésions au niveau du pancréas endocrine, qui évolueront en TNE pancréatiques malignes. Des autres lésions tumorales autres que neuroendocrines sont aussi présentes (lipomes, méningiomes, angio-fibromes …). La prévalence est estimée à 1/40 000.

Le gène en cause, *NEM1,* est situé sur le chromosome 11 (11q13). Des mutations germinales de *NEM1* sont identifiables chez 70 à 90% des familles touchées par ce syndrome. Ces mutations sont à l'origine d'une troncature ou d'une perte de fonction de la ménine. Cette protéine est normalement exprimée de façon ubiquitaire et localisée préférentiellement dans le noyau (Chandrasekharappa et al. 1997). Elle pourrait interagir avec plus de 40 protéines, et ainsi être impliquée dans un grand nombre de fonctions biologiques, comme la modification de la chromatine, la réparation de l'ADN, la transcription, la division cellulaire, la dégradation des protéines, la mobilité et l'adhésion cellulaire (Agarwal 2013).

D'autres types de NEM existent, comme la NEM de type 2 (NEM2) qui est due à des mutations germinales activatrices du proto-oncogène *RET*, situé sur le chromosome 10 (10q11.2). La prévalence des NEM2 est estimée à environ 1/35 000. Ce gène code pour un récepteur tyrosine-kinase, qui va activer des voies de signalisation comme RAS/MAPK et PI3K/Akt (Wells, Clin Cancer Res, 2009), entrainant principalement des tumeurs de la thyroïde et des glandes parathyroïdes (Donis-Keller et al. 1993).

La NEM4 est provoquée par des mutations germinales du gène *CDKN1B* régulateur du cycle cellulaire (chromosome 12p13), à l'origine d'une perte de fonction de CK1P27^{kip1} (cyclin-dependent kinase inhibitor). Les patients atteints de NEM4 présentent des TNE de la parathyroïde et de l'hypophyse principalement (Pellegata et al. 2006; Thakker 2014).

2.4.2. Le syndrome de Von Hippel-Lindau

Ce syndrome à transmission autosomique dominant présente une prévalence estimée à 1/53 000 (Maher et al. 1991). La maladie est due à des mutations germinales inactivatrices du gène suppresseur de tumeur *VHL* (chromosome 3p25.3), qui régule notamment les facteurs de transcription induit par l'hypoxie (Hypoxia inducible factors, HIF) (Nordstrom-O'Brien et al. 2010). L'absence de la protéine pVHL a pour conséquence une accumulation des HIFs, aboutissant à une production incontrôlée de facteurs de croissance comme le VEGF (Vascular endothelial growth factor). Ce syndrome se caractérise par le développement d'hémangioblastomes de la rétine et du système nerveux central, des phéochromocytomes et des tumeurs pancréatiques.

2.4.3. La neurofibromatose de type 1

La neurofibromatose de type 1 (NF1) est un syndrome à transmission autosomique dominant, caractérisé par la survenue de tumeurs cutanées, de gliomes du nerf optique et de neurofibromes, et l'apparition de taches « café-au-lait » sur la peau. Les endocrinopathies sont moins fréquentes et comprennent des phéochromocytomes et des TNE duodénales principalement (McGaughran et al. 1999; Griffiths, Williams, et Williams 1987). C'est une maladie génétique assez fréquente avec une prévalence estimée à 1/3 000 à 1/4 000. Le gène muté *NF1* (chromosome 17q11-2) est un gène suppresseur de tumeur. Sa mutation est à l'origine d'une perte de fonction de la protéine neurofibromine, ne lui permettant plus de réguler négativement la protéine oncogène Ras. Ainsi, Ras peut maintenir activées les voies de signalisation RAS/ERK/MAPK (Martin et al. 1990; Wallace et al. 1990) et mTOR (Johannessen et al. 2005).

2.5. Autres altérations génétiques mises en évidence dans les NNE GEP

Le mécanisme essentiel de l'initiation et de la formation d'un clone néoplasique à partir d'une cellule saine est l'activation de certains oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs par mutation. Toutefois, les principaux oncogènes (*SRC*, *MYC*, *RAS*, *FOS*, *HER2* …) et les principaux gènes suppresseurs de tumeurs connus (*TP53*, *BRCA*, *RB1* …) ne sont en général par altérés dans les TNE, à l'exception des CNE. En effet, le séquençage de l'exome de CNE pancréatiques montre que les gènes suppresseurs de tumeurs *RB1* et *TP53* sont très fréquemment mutés. Un marquage p53 anormal et une perte d'expression de la protéine Rb sont retrouvés dans 95 et 74% des cas respectivement, dans une étude menée sur 19 biopsies de CNE pancréatiques (Yachida et al. 2012). Cette étude a également démontré la présence de mutations de *KRAS*, *Smad4* et *p16* dans les CNE pancréatiques.

Ces mutations ne sont pas retrouvées après séquençage de l'exome de TNE pancréatiques (Yachida et al. 2012), mais des mutations des gènes codant pour les protéines DAXX (Death-domain associated protein) et ATRX (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) sont retrouvées dans 43% des TNE pancréatiques (Jiao et al. 2011). DAXX et ATRX sont deux protéines d'un complexe impliqué dans le remodelage de la chromatine. L'étude de Yachida *et al.* a confirmé la perte d'expression de DAXX et ATRX dans 45% des 11 biopsies de TNE pancréatiques analysées (Yachida et al. 2012).

Des mutations de gènes de plusieurs composants de la voie mTOR (*PTEN*, *TSC2*, *PIK3CA*) ont été retrouvées dans 14% des TNE pancréatiques (Jiao et al. 2011) et dans 33% des TNE intestinales (Banck et al. 2013). Des mutations récurrentes (délétions) ont aussi été identifiées pour le gène *CDKN1B*, dans environ 9% TNE intestinales (Francis et al. 2013; Banck et al. 2013; Crona et Skogseid 2016). Ce gène code pour $CK1P27^{kip1}$, un régulateur négatif du cycle cellulaire, suggérant un rôle potentiel des mécanismes de régulation du cycle cellulaire dans la tumorigenèse et la progression des TNE intestinales. A ce jour, environ 24 gènes ont été associés à la tumorigenèse neuroendocrine (syndrome héréditaire ou mutations sporadiques) (Crona et Skogseid 2016) (Tableau 4).

Tableau 4 : Gènes impliqués dans le tumorigenèse neuroendocrine. Adaptée de Crona, EJE, 2016.

Gène	Fonction	Spécificité d'organe
ATM	Intégrité de la chromatine	Pancréas
ATRX	Remodelage de la chromatine	Pancréas, médullo-surrénale
CDKN1B	Cycle cellulaire	Pancréas, intestin grêle, parathyroïdes, antéhypophyse
DAXX	Remodelage de la chromatine	Pancréas
EPAS1	Voie de signalisation	Médullo-surrénale, duodenum
H-, K-RAS	Voie de signalisation	Médullo-surrénale, thyroïde
FH	Métabolisme	Médullo-surrénale
KTMD2	Modification de la chromatine	Médullo-surrénale
MAX	Voie de signalisation	Médullo-surrénale
MEN1	Inconnue	Parathyroïde, antéhypophyse, pancréas, duodenum, poumon, thymus
NF1	Voie de signalisation	Médullo-surrénale, duodenum
RET	Voie de signalisation	Thyroïde, parathyroïde, médullo-surrénale
SDHx	Métabolisme	Médullo-surrénale
TMEM127	Voie de signalisation	Médullo-surrénale
TP53	Intégrité de la chromatine, voies de signalisation	Pancréas, médullo-surrénale
TSC1-2	Voie de signalisation	Pancréas
YY1	Régulation transcriptionnelle	Pancréas

Ainsi, le profil génétique des NNE GEP survenant de façon sporadique diffère d'une part selon le grade du NNE, d'autre part selon la localisation tumorale. On ne retrouve pas toujours le même type de mutation entre une TNE pancréatique ou intestinale par exemple. L'analyse génomique d'un plus grand nombre de tumeurs devrait aider à identifier de nouvelles protéines ou voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse des NNE GEP.

2.6. Diagnostic

Les NNE GEP sont des tumeurs rares, et leur diagnostic va dépendre du type de NNE ainsi que de leur localisation et du degré d'envahissement de la tumeur.

2.6.1. Présentation clinique des TNE GEP

Du fait de leur prolifération lente et donc de leur évolution lente, les TNE GEP sont détectées tardivement et de manière fortuite dans plus de 80% des cas. Le plus souvent, leur découverte est due à la présence de symptômes liés à la masse tumorale (compression) ou aux métastases hépatiques (compression, obstruction des canaux biliaires entrainant un ictère …) (Modlin et al. 2005; Kaltsas, Besser, et Grossman 2004). Le diagnostic se fait en moyenne cinq à sept ans après l'apparition de la tumeur.

Les TNE sont fonctionnelles lorsqu'elles produisent et sécrètent de grandes quantités d'hormones qui conduisent à des symptômes spécifiques de l'hormone surproduite. Les TNE pancréatiques fonctionnelles regroupent entre autres les insulinomes, les gastrinomes, les VIPomes, les glucagonomes et les somatostatinomes, qui se distinguent par le type cellulaire concerné par l'atteinte tumorale, et donc l'hormone sécrétée. Dans le cas de l'insulinome, la sécrétion excessive d'insuline entrainera une hypoglycémie chez le patient, et les symptômes qui y sont associés (transpiration, fatigue, étourdissements …).

Présent dans moins de 10% des cas, le syndrome carcinoïde est dû à la sécrétion excessive de sérotonine. Il est souvent le reflet d'une maladie métastatique et se traduit par des flushs cutanés, des diarrhées motrices, des douleurs abdominales, des anomalies cardiaques, comme la valvulopathie tricuspide ou pulmonaire, une hypotension artérielle, une bronchoconstriction (Strosberg 2012). Cette symptomatologie est en rapport avec la libération de médiateurs vasoactifs comme la sérotonine, les prostaglandines, la tachykinine et la bradykinine (Massironi et al. 2008).

La fréquence des tumeurs fonctionnelles est faible : elle concerne moins de 20% des patients. Les syndromes fonctionnels les plus fréquents sont les syndromes carcinoïdes et ceux associés aux insulinomes et aux gastrinomes (T. Walter, Scoazec, et Lepage 2013). Les tumeurs dites non fonctionnelles sont des tumeurs n'induisant pas de symptômes liés à la sécrétion de peptides hormonaux (Ito, Igarashi, et Jensen 2012).

2.6.2. Présentation clinique des CNE GEP

Des données récentes sur la présentation initiale des CNE GEP ont été rapportées dans 2 études rétrospectives et une étude de cohorte française (M. Heetfeld et al. 2015; H. Sorbye et al. 2013; T. Walter et al. 2015). Contrairement aux TNE bien différenciées, les CNE sont diagnostiqués devant des symptômes de survenue généralement récente avec une altération de l'état général rapide (amaigrissement, fièvre, douleurs, ictère …). Moins de 5% des CNE sont de découverte fortuite (Smith et Reidy-Lagunes 2013).

Les CNE fonctionnelles sont rares (moins de 3 à 5% des CNE) et le syndrome sécrétoire est généralement différent de ceux habituellement rencontrés dans les TNE (sécrétion d'ACTH avec syndrome de Cushing ou de PTHrp avec hypercalcémie).

2.6.3. Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique repose sur la mesure de la concentration plasmatique de chromogranine A en première intention. C'est un marqueur relativement sensible (60 à 90% de sensibilité) (Modlin, Ann surg oncol, 2010) et fiable pour la détection des rechutes (Pirker et al. 1998). En effet, la concentration plasmatique de la chromogranine A peut augmenter de 60 à 80% en cas de présence d'un NNE GEP (Peracchi et al. 2003). La chromogranine A est également un marqueur pronostique de survie, et un marqueur prédictif de réponse au traitement (Chou et al. 2014).

Néanmoins, il existe d'autres causes non tumorale d'élévation de la chromogranine A. Les plus fréquentes sont l'insuffisance rénale et toutes les situations d'hypergastrinémie (traitement par inhibiteur de la pompe à protons, gastrite atrophique fundique liée à une maladie de Biermer ou à une infection à Helicobacter pylori) (Vezzosi et al. 2011). Le dosage de la chromogranine A est donc réalisé après au minimum 7 jours d'arrêt de traitement par IPP si le patient est traité.

Dans le cas d'une TNE fonctionnelle, un dosage du peptide est réalisé en fonction de la symptomatologie fonctionnelle (insuline dans le cas d'un insulinome, gastrine pour un gastrinome, VIP (vaso-active intestinal polypeptide) pour le VIPome …) (Alexandraki et Kaltsas 2012). Face à un syndrome carcinoïde, un dosage urinaire du métabolite de la sérotonine, le 5-HIAA (acide 5-hydroxy-indole acétique) est demandé. Dans les autres cas, il n'est indiqué que pour les TNE de l'intestin grêle et du côlon droit.

Le dosage plasmatique de la NSE peut être effectué mais il est relativement peu sensible (Baudin et al. 1998).

2.6.4. Diagnostic anatomopathologique

La confirmation du diagnostic de NNE repose sur l'analyse anatomopathologique sur biopsie, qui permet d'affirmer le diagnostic et de déterminer les facteurs histo-pronostiques. Elle est incontournable avant tout traitement anti-tumoral, mais ne doit pas retarder le traitement symptomatique.

L'analyse histologique des cellules tumorales permettra de définir la morphologie cellulaire (tumeur bien ou peu différenciée). L'évaluation de degré de prolifération cellulaire repose sur la détermination de l'index de prolifération et l'analyse du nombre de mitoses. Elle permet d'identifier le grade tumoral selon la classification OMS de 2010 (cité § 2.3. Classification des NNE GEP) (tableau 2).

La confirmation du diagnostic repose sur la présence d'un marqueur immunohistochimique endocrine et d'au moins un marqueur neuroendocrine. Le marqueur endocrine le mieux caractérisé et le plus utilisé pour le diagnostic et le suivi des NNE GEP est la chromogranine A. Parmi les marqueurs neuroendocrine, le marquage de la synaptophysine est le plus couramment utilisé, du fait de sa plus grande sensibilité. La protéine PGP9.5 est aussi spécifique et sensible et pourra être recherchée en cas de nécessité. La protéine N-CAM est à éviter car d'autres types de tumeurs, notamment exocrines, peuvent l'exprimer (Scoazec 2005).

Le compte-rendu anatomopathologique devra aussi rendre compte de l'extension de la tumeur (invasion) et du stade TNM.

Une relecture de l'examen anatomopathologique par les membres du réseau TENpath pour avis ou validation d'un diagnostic est indispensable pour les CNE, pour les TNE bien différenciées dont le Ki67 est compris entre 20 et 50%, pour les suspicions de TNE de phénotype immunohistochimique incomplet et pour les suspicions de carcinome mixte, comportant un contingent neuroendocrine.

2.6.5. Examens morphologiques initiaux

Les explorations tumorales à l'aide des techniques d'imagerie permettent de connaître la localisation de la tumeur ainsi que son étendue et l'éventuelle présence de métastases. L'une des méthodes de détection les plus couramment utilisées est la tomodensitométrie (TDM) thoraco-abdomino-pelvienne, qui permet de préciser les dimensions tumorales et l'extension métastatique. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est plus sensible que la TDM, notamment pour la détection des métastases hépatiques et osseuses. Lors du bilan initial, il est recommandé de pratiquer une IRM hépatique, en complément de la TDM, afin de faire un bilan exhaustif de l'éventuelle atteinte hépatique et d'évaluer au mieux la stratégie thérapeutique à adopter (« Thésaurus National de Cancérologie Digestive » 2016).

Dans le cas des TNE GEP, une scintigraphie des récepteurs de la somatostatine (SRS) (Octréoscan®) est réalisée, du fait de sa grande sensibilité pour ce type de tumeurs. En effet, les TNE expriment un très grand nombre et une grande variété de récepteurs à la somatostatine (SSTR), dont les sous-types SSTR1 et SSTR2 sont exprimés dans plus de 80% des TNE digestives (Hofland et Lamberts 2001; Janson et Oberg 2003). Le pentétréotide marqué à l'indium 111 (Octréoscan®) se lie spécifiquement aux récepteurs de la somatostatine et permet la détection des TNE GEP par SRS. La SRS n'est pas utilisée pour la détection des CNE car ils n'expriment pas ou peu les SSTR.

La tomographie par émission de positons avec injection de ^{18}F-fluorodésoxyglucose (TEP-^{18}FDG) fournit un complément lors de l'évaluation au diagnostic, notamment quand la TNE est négative pour la SRS ou lorsque l'indice de prolifération est élevé (Ki-67 > 10 %). Les CNE sont très sensibles au TEP-^{18}FDG, car ce sont des tumeurs qui consomment beaucoup de glucose du fait de leur caractère très prolifératif.

2.7. Pronostic

L'étude de 35 825 cas de NNE aux Etats-Unis, basée sur les données Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER) de 1973 à 2004 rapporte une médiane de survie globale de 75 mois pour l'ensemble des NNE (Yao, Hassan, et al. 2008). Les TNE de grade 1 présentent une médiane de survie globale de 124 mois, contre 64 mois pour les TNE de grade 2. Enfin, cette étude montre que les CNE (de grade 3) ont une médiane de survie globale de 10 mois (Yao, Hassan, et al. 2008).

Concernant les TNE de grades 1 et 2, plusieurs facteurs pronostiques ont été clairement identifiés. Le stade de la maladie, localisé, régional ou métastatique est un important facteur pronostique. En effet, la survie médiane pour une maladie localisée s'élève à 223 mois, alors qu'elle n'est plus de 111 mois pour un stade régional, et enfin 33 mois lorsque la maladie est métastatique. Tous stades confondus, les patients présentant une TNE de grade 1 survivront plus longtemps que les patients ayant une TNE de grade 2. En fonction du stade de la maladie, la localisation de la tumeur primaire est aussi un facteur pronostique. Chez les patients dont la maladie est localisée ou régionale, une tumeur primaire de l'appendice est de meilleur pronostic qu'une tumeur primaire hépatique (360 mois *versus* 50 mois). Lorsque la maladie est métastatique, les tumeurs du jéjunum ou iléales sont de meilleur pronostic que les tumeurs du colon (56 mois *versus* 5 mois). Il a été retrouvé que l'âge au diagnostic, le sexe et l'ethnie sont des facteurs pronostiques de survie également. Les femmes survivent plus longtemps, tous stades confondus, par rapport aux hommes, tout comme les personnes de moins de 30 ans, comparé aux 30-60 ans et aux plus de 60 ans (Yao, Hassan, et al. 2008).

Concernant les CNE, très agressifs et donnant très peu de chance de survie aux patients, le pronostic spontané des patients reste très péjoratif avec une survie médiane en l'absence de traitement de 6 à 7 mois et un taux de survie relative à un an inférieur à 20%. Dans 3 études récentes, la survie médiane était de 10 à 14 mois pour l'ensemble de la population (M. Heetfeld et al. 2015; H. Sorbye et al. 2013; T. Walter et al. 2015). Tout comme pour les TNE G1 et G2, le stade est un important facteur pronostique, avec 38 mois de survie médiane pour les stades localisés, contre 5 mois pour les CNE d'emblée métastatique (Halfdan Sorbye et al. 2014). Par contre, l'impact de la localisation de la tumeur primaire sur le pronostic reste controversé. De récentes études ont analysées l'intérêt des dosages biologiques pour le pronostic des CNE, face au manque de facteurs pronostiques pour ce type de tumeurs. Ainsi, une hyperplaquettose, un taux de LDH et d'ASAT, ou un taux de NSE élevé au diagnostic sont de mauvais pronostic (Annexe (Freis et al. 2017)) (H. Sorbye et al. 2013; Lamarca et al. 2017).

L'évaluation du pronostic évolue avec l'avancée des technologies. L'analyse transcriptomique des TNE pourrait devenir un nouveau moyen de pronostic. L'étude de Pavel *et al.* a montré que cette analyse est d'intérêt significativement supérieur au dosage de la chromogranine A, actuellement fait tout au long du suivi du patient (M. Pavel et al. 2016; Modlin, Drozdov, et Kidd 2013). Cette signature moléculaire, mesurée dans le sérum du patient par RT-PCR (panel de 51 gènes) puis analysée par une série d'algorithmes, permet d'établir un score. Ce score est doté d'une

forte sensibilité (85-98%) et d'une forte spécificité (93-97%). Il est corrélé à l'agressivité de la maladie et possède une forte valeur prédictive positive et négative (Modlin, Bodei, et Kidd 2016). Cette étude n'a pas encore été étendue aux CNE.

2.8. Traitement

Les traitements proposés aux patients atteints de NNE GEP vont dépendre du grade, du stade de la maladie et des symptômes présents ou non. La seule option curative reste la résection chirurgicale de la tumeur primaire et des métastases si possible, et elle doit toujours être considérée. Durant les dernières décennies, la prise en charge des patients a grandement évolué, passant des soins palliatifs à la chimiothérapie, qui elle-même peut combiner différents agents cytotoxiques, et aujourd'hui utilisant les thérapies ciblées qui, comme leur nom l'indique, vont cibler une voie moléculaire altérée dans les NNE GEP.

La priorité devant les NNE GEP est de traiter, s'il est présent, le syndrome hormonal en inhibant la sécrétion des hormones et des amines vasoactives. Les figures 3 et 4 représentent deux algorithmes permettant de schématiser la prise en charge des NNE GEP.

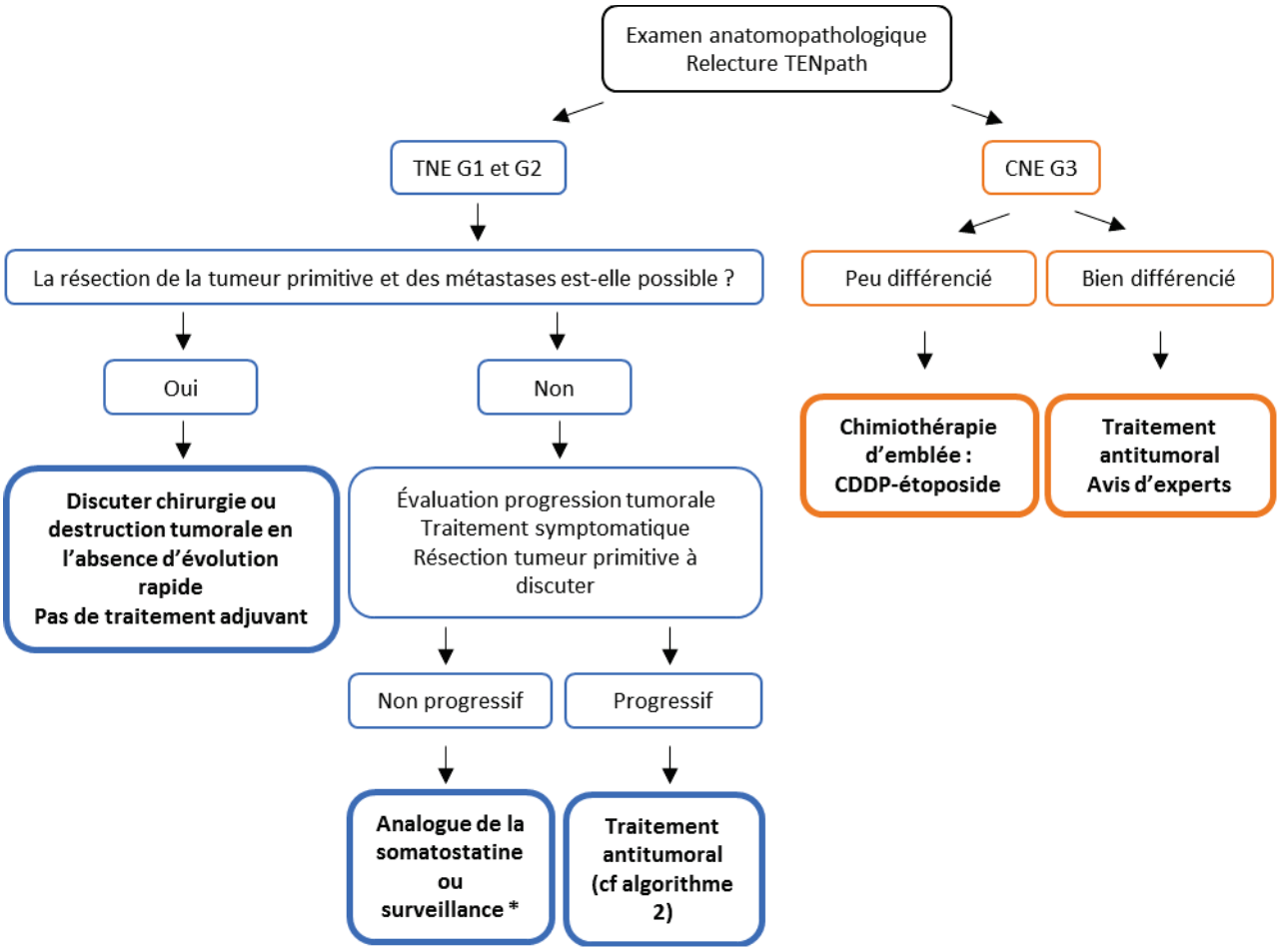
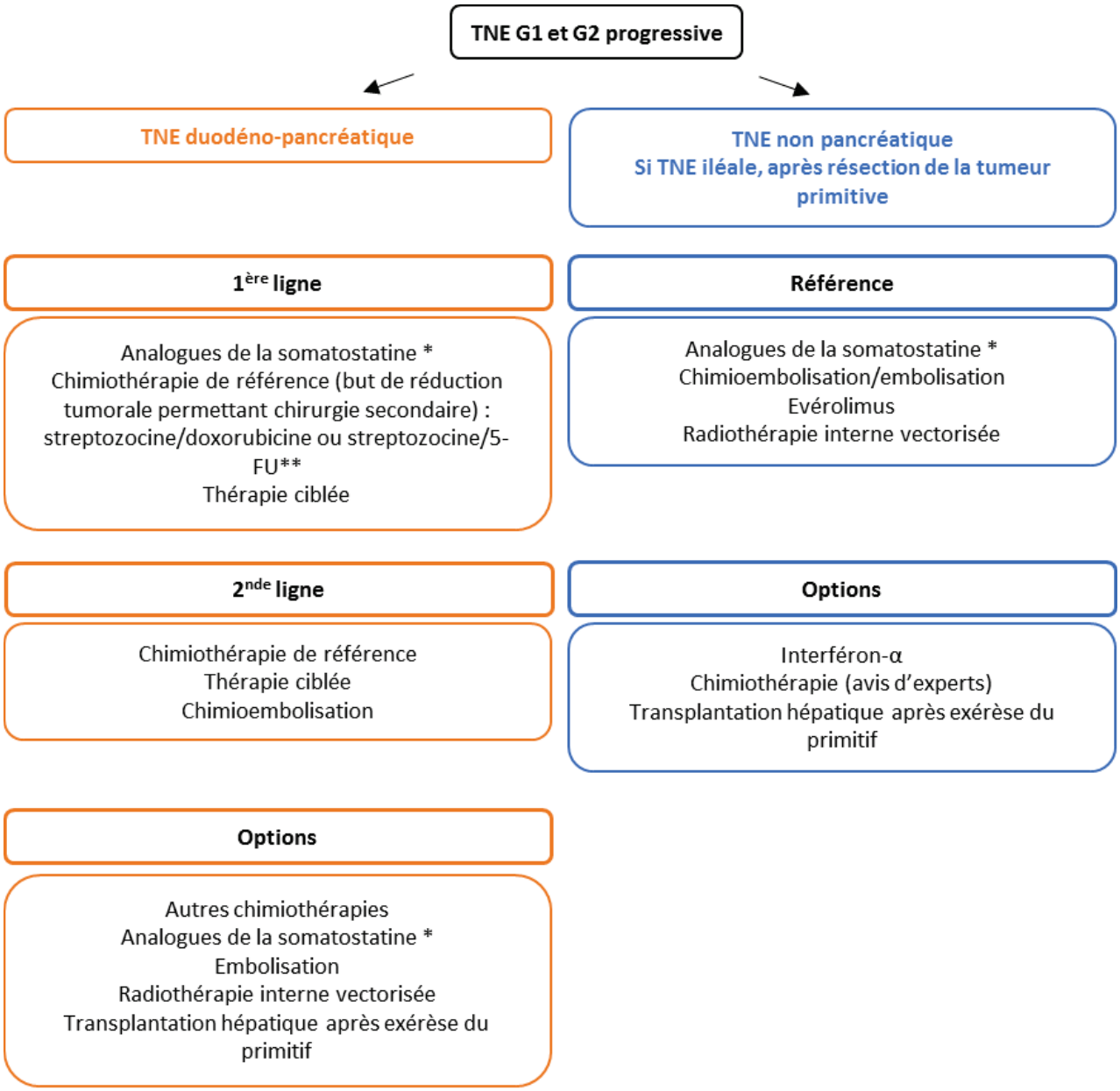


Figure 3 : Algorithme 1 : Prise en charge d'une TNE métastatique du tube digestif. Adapté de (« Thésaurus National de Cancérologie Digestive » 2016).



*: envahissement hépatique <25-50% et progression lente, Ki67 < 2% (TNE grêle) ou 5% (TNE pancréas)
**: compte-tenu de la toxicité rénale potentielle de la streptozocine et de la toxicité cardiaque de la doxorubicine, d'autres chimiothérapies sont recommandées : dacarbazine/5-FU, témozolomide/capécitabine, oxaliplatine

Figure 4 : Algorithme 2 : Traitement des TNE métastatiques bien différenciées, progressives et non résécables du tude digestif. Adapté de (« Thésaurus National de Cancérologie Digestive » 2016).

2.8.1. Traitement des symptômes liés aux sécrétions tumorales

Lorsque le syndrome sécrétoire existe, le traitement des symptômes liés aux sécrétions tumorales est prioritaire et doit être débuté dès que le prélèvement des marqueurs biologiques est effectué.

Par exemple, dans le cas d'un insulinome, on veillera à un apport suffisant de sucre. Du diazoxide sera administré car il permet d'inhiber la sécrétion d'insuline en maintenant une hyperpolarisation de la membrane des cellules β-pancréatiques (Panten et al. 1989).

Les analogues de la somatostatine

Le soulagement des symptômes du syndrome carcinoïde peut être obtenu par l'administration d'analogues de la somatostatine. La somatostatine est un inhibiteur de l'hormone de croissance (Brazeau et al. 1973). Elle agit via les récepteurs à la somatostatine (SSTR). La somatostatine inhibe plusieurs fonctions physiologiques comme la motilité intestinale, les contractions de la vésicule biliaire, les sécrétions exocrines et endocrines dont celles de l'insuline, du glucagon, de la sécrétine, de la gastrine, de la substance P, de la cholécystokinine et du VIP (Krulich, Dhariwal, et McCann 1968; Reichlin 1983).

Les analogues de la somatostatine entrent en compétition avec la somatostatine au niveau des SSTR. Ils permettent de diminuer la sécrétion des substances vasoactives sécrétées en excès par la tumeur (Khagi et Saif 2013).

Le premier analogue synthétique développé puis testé en clinique à partir de 1982 est l'octréotide (Bauer et al. 1982). Son effet inhibiteur est plus puissant que la somatostatine (Lamberts et al. 1996). Initialement disponible sous forme de libération immédiate, en injection intraveineuse ou par administration sous-cutanée, de nouvelles formulations sont aujourd'hui disponibles, appelées forme retard, administrée en injection intramusculaire. Le lanréotide, disponible sous forme retard (intramusculaire ou sous-cutanée profonde), possède une AMM depuis 1995 pour le traitement des syndromes carcinoïdes. Ces deux analogues se fixent préférentiellement au récepteur à la somatostatine SSTR-2 et SSTR-5, et ne se lient pas aux récepteurs SSTR-1 et SSTR-4 (T. Walter et Lombard-Bohas 2011).

Ces analogues contrôlent l'hypersécrétion chez 40 à 60% des patients et ils permettent une baisse ou une stabilisation des marqueurs tumoraux chez 30 à 75% des patients répondants, en

fonction du type tumoral (Eriksson et Öberg 1999; Panzuto et al. 2006; Rubin et al. 1999; Welin et al. 2004). Une stabilisation de la taille tumorale est obtenue pour environ 50% des patients (Shojamanesh et al. 2002; Panzuto et al. 2006). Néanmoins, la régression tumorale sous analogues de la somatostatine reste très rare, elle concerne moins de 5% des patients (Reidy, Tang, et Saltz 2009; Saltz et al. 1993). L'étude PROMID de phase III, conduite sur 85 patients, est la première démontrant un effet anti-tumoral de l'octréotide (sous forme retard) pour les TNE bien différenciées, inopérables ou métastatiques de l'intestin moyen. Les résultats de ces travaux montrent un allongement du temps à progression de 14,3 mois pour le groupe octréotide contre 6 mois pour le groupe placebo, et une stabilisation de la maladie atteinte chez 67% des patients recevant l'octréotide, contre 37% dans le groupe placebo (Rinke et al. 2009).

L'activité antiproliférative des analogues de la somatostatine s'explique par des mécanismes directs et indirects. Parmi les effets directs, des études menées *in vitro* ont démontré que tous les sous-types de SSTR (1 à 5) diminuaient la prolifération cellulaire (Weckbecker et al. 2003). Les sous-types 2 et 3 induisaient l'apoptose dans les cellules MCF-7 de cancer du sein et dans les lymphocytes (Sharma et Srikant 1998; Lattuada et al. 2002) par l'induction des protéines pro-apoptotiques p53 et Bax et par l'inhibition de la voie de signalisation impliquée dans la prolifération Ras/Raf/MAPK (Florio et al. 2000). Les effets indirects reposent sur l'inhibition par la somatostatine et ses analogues de la sécrétion de facteurs de croissance comme l'IGF (insulin growth factor), l'EGF (epidermal growth factor), et l'hormone de croissance (Ambler et al. 1996; Serri et al. 1992). Enfin, l'effet antiangiogénique de l'octréotide a été démontré dans plusieurs modèles cellulaires de tumeurs (Woltering et al. 1997). Il inhibe la sécrétion du facteur VEGF et réduit ainsi la prolifération des cellules endothéliales autour de la tumeur (Kumar et al. 2004; Adams et al. 2005).

Un nouvel analogue de la somatostatine, le pasireotide (SOM230) possède une meilleure affinité pour les récepteurs SSTR-1, SSTR-3 et SSTR-5, en comparaison à l'octréotide (Schmid et Schoeffter 2004; T. Walter et Lombard-Bohas 2011). Une étude clinique de phase I a été conduite chez 42 patients présentant une TNE GEP réfractaire aux analogues de la somatostatine (octréotide et lanréotide), afin d'évaluer les propriétés pharmacocinétiques, pharmacodynamiques, ainsi que la tolérance au traitement (Wolin et al. 2013). Quinze patients ont développé des effets secondaires de grade 3/4 (diabète et rougeurs principalement). L'efficacité est évaluée dans une étude clinique de phase II chez 45 patients avec une TNE fonctionnelle et réfractaires à l'octréotide (Kvols et al. 2012). Après 15 jours de traitement, 27% des patients ont obtenu un contrôle partiel ou complet du syndrome carcinoïde. Il n'y a pas de réponses objectives sur la taille tumorale (réponse complète ou

partielle), mais 57% des patients présentaient une stabilisation de la maladie après 6 mois. Les résultats d'une étude de phase III, comparant l'octréotide retard et le pasireotide, chez 216 patients atteints de TNE métastatiques réfractaires aux analogues de la somatostatine, ont montré que le contrôle des symptômes après 6 mois était identique mais que le pasiréotide apportait un bénéfice sur la survie sans progression (11,8 mois versus 6,8 mois) (Wolin et al. 2015).

L'interféron-α

L'intérêt de l'interféron-α (IFN-α) dans le traitement des TNE a été établi en 1983 par Oberg *et al.* Il a démontré que l'IFN-α stimulait les lymphocytes T qui neutralisent les substances vasoactives sécrétées par les TNE (Öberg, Funa, et Alm 1983).

En plus de son action sur les substances vasoactives, l'IFN-α stabilise la progression tumorale chez 68% des patients atteints de TNE progressives (n=26 patients) (Schöber et al. 1992).

Detjen *et al.* ont démontré le mécanisme de l'inhibition de la croissance par l'IFN-α sur les lignées cellulaires de tumeurs neuroendocrines BON et QGP1 (Detjen et al. 2000). Il inhibe directement la croissance de ces cellules en perturbant le cycle cellulaire : les cellules traitées entrent beaucoup plus lentement en phase G_2/M.

Une étude menée chez 68 patients atteints de TNE intestinales rapporte que l'association IFN-α/analogues de la somatostatine permet de diminuer le risque de progression, avec une meilleure médiane de survie de 51 mois, comparé à 35 mois pour les analogues utilisés seuls (Kölby et al. 2003). Ces données n'ont cependant pas été confirmées, rétrospectivement sur 109 patients atteints de TNE progressives et métastatiques (Arnold et al. 2005) et prospectivement, chez 80 patients atteints de TNE métastatiques (Faiss et al. 2003).

Son ajout pour le contrôle d'un syndrome carcinoïde réfractaire aux analogues de la somatostatine peut cependant être bénéfique, même s'il entraîne de nombreux effets secondaires (symptômes pseudo-grippaux, dépression, insomnies, érythème et induration au lieu d'injection …).

2.8.2. Chirurgie

La chirurgie est le seul traitement curatif des NNE GEP, mais elle ne peut être pratiquée que dans certaines situations cliniques particulières. C'est le traitement de première ligne dans le cas

des TNE bien différenciées et non métastatiques. Dans le cas d'une TNE bien différenciée présentant des métastases hépatiques, il est toujours envisagé la résection de la totalité de la tumeur primitive et des lésions tumorales secondaires, combinant si besoin d'autres techniques de destruction tumorale comme la radiofréquence ou les micro-ondes (« Thésaurus National de Cancérologie Digestive » 2016). Parmi les TNE bien différenciées, les insulinomes présentent le taux de guérison le plus fort après chirurgie, avec 85 à 95% des patients guéris parmi les 90 à 100% ayant subi une énucléation de la tumeur ou une résection du pancréas (Norton 2006). Les TNE les plus agressives et les CNE peu différenciés présentent un taux de récurrence élevé. La chirurgie n'est alors pratiquée que si les tumeurs ne sont pas métastatiques (moins de 20% des cas) et seulement si la chirurgie paraît curative et sans risque majeur pour le patient (« Thésaurus National de Cancérologie Digestive » 2016).

2.8.3. Chimiothérapie

Comme le démontre les algorithmes décrivant la prise en charge des NNE GEP, le choix de la chimiothérapie va dépendre du grade, de la localisation et de la chimiosensibilité de la tumeur (Figure 3 et 4). Les CNE sont hautement prolifératifs (indice Ki-67 > 20%) et sont plus sensibles à la chimiothérapie que les TNE qui sont peu prolifératives.

Pour les patients porteurs d'une TNE bien différenciée à l'évolution stable et sans métastase, la stratégie adoptée est la surveillance médicale (« wait and see strategy »). Pour les TNE bien différenciées mais progressives, la chimiothérapie est le traitement de référence et différentes combinaison de molécules sont actuellement utilisées suivant la localisation tumorale.

L'association streptozocine/doxorubicine (antibiotique et agent alkylant inhibant l'initiation de la synthèse d'ADN/agent intercalant se fixant rapidement sur les structures nucléaires de la cellule, bloquant la synthèse de l'ADN et de l'ARN) est le traitement de référence pour les TNE bien différenciées pancréatiques ou duodénales. Moertel *et al*. ont démontré un taux de réponse de 69% et une médiane de survie de 20 mois pour 38 patients recevant la combinaison streptozocine/doxorubicine (Moertel et al. 1992). La doxorubicine peut être remplacée par le 5-fluorouracile, un antimétabolite antipyrimidine. Cette association est aussi bénéfique, avec une réduction de la masse tumorale de 30% chez un tiers des patients traités (Kouvaraki et al. 2004), mais avec un taux de réponse plus faible de 45%, et une médiane de survie de 12 mois (Moertel et al. 1992).

Les TNE de l'intestin sont particulièrement réfractaires aux molécules cytotoxiques, comme l'association temozolomide/thalidomide (agent alkylant de la guanine/molécule au mécanisme d'action encore mal défini : antitumorale grâce à l'inhibition de la production de TNF-α (Tumor necrosis factor-α) et de l'angiogenèse pour ce qui est connu). Le taux de réponse est de 7% pour les TNE intestinales, alors qu'il est de 45% pour les TNE pancréatiques, dans une étude de phase II menée sur 29 patients (Kulke et al. 2006). Les TNE pancréatiques sont déficientes pour une enzyme réparatrice de l'ADN, la MGMT (methylguanine-DNA-methyltransferase), comparée aux TNE intestinales, pouvant expliquer cette différence de réponse au traitement (Kulke et al. 2006).

La chimiothérapie est le traitement de référence des CNE. Les patients recevront en première intention et immédiatement après la confirmation du diagnostic une thérapie à base de sels de platine (cisplatine ou carboplatine) et étoposide (inhibiteur de la topoisomérase II, inhibant l'entrée en mitoses des cellules tumorales). Les taux de réponse objectives varient selon les études entre 30 et 67% (Moertel et al. 1991; E Mitry et al. 1999; H. Sorbye et al. 2013).

2.8.4. Autres traitements

Traitement des métastases hépatiques

Le traitement des métastases hépatiques peut faire l'objet d'un traitement local. La résection chirurgicale est possible après évaluation de la taille, de la localisation, du degré de prolifération et de l'extension des lésions hépatiques (Que et al. 1995). Elle se fera uniquement en présence de lésions hépatiques limitées et si plus de 90% des métastases peuvent être retirés (Sarmiento et al. 2003; Norton et al. 2003). Dans le cas de métastases hépatiques plus diffuses, l'embolisation artérielle hépatique ou la chimio-embolisation peuvent être effectuées (en seconde ligne des TNE duodéno-pancréatiques bien différenciées, en cas de métastases progressives malgré le traitement symptomatique pour les TNE bien différenciées de l'iléon).

L'embolisation artérielle hépatique consiste à mettre en place dans l'artère hépatique une sonde, introduite par voie fémorale, et à injecter des agents embolisants résorbables ou non (gel mousse ou particules), afin de générer une nécrose au sein du tissu tumoral. La chimio-embolisation permet d'associer une chimiothérapie locale intra-artérielle et une embolisation. Les molécules utilisées sont la doxorubicine ou la streptozocine (Dominguez et al. 2000). Il n'existe à ce jour pas de consensus pour l'une ou l'autre technique.

Une approche plus récente pour le traitement des métastases hépatiques est l'injection intra-artérielle de ^{90}Yttrium incorporé dans des microsphères, technique connue sous le nom de radio-embolisation intrahépatique sélective. Elle permet la délivrance d'un radionucléide directement au niveau des métastases hépatiques, sans provoquer d'ischémie. Les taux de réponse chez des patients porteurs de TNE métastatiques sont encourageants, s'élevant entre 51 et 63% dans 2 études menées sur 148 et 42 patients (Kennedy et al. 2008; Rhee et al. 2008).

Radiothérapie métabolique

La radiothérapie métabolique repose, tout comme pour les analogues de la somatostatine, sur l'expression des SSTR par les TNE GEP. Ce traitement consiste à administrer des analogues de la somatostatine radiomarqués, afin d'améliorer le ciblage des tumeurs par la radiation. Le premier radio-peptide étudié est le ^{90}Y-octreotide, connu sous le nom DOTATOC (^{90}Y labeled peptide – [DOTA^0, Tyr3]-octreotide) (Waldherr et al. 2001). Malgré une augmentation de la survie globale, le DOTATOC est associé une myélotoxicité transitoire, et une toxicité rénale permanente, révélée dans une étude menée sur 1109 patients atteints de TNE métastatiques (Imhof et al. 2011). Cela a permis la synthèse du ^{177}Lu-octreotate ou DOTATATE (^{177}Lu labeled peptide [DOTA^0, Tyr3]-octreotate). Romer *et al.* ont comparé ces deux traitements sur une cohorte de 910 patients. La médiane de survie des deux traitements est comparable, mais le DOTATATE est moins myélotoxique que le DOTATOC. La toxicité rénale est au contraire identique (Romer et al. 2014). Un taux de réponse objective de 30% a été retrouvé chez 504 patients recevant du DOTATATE (Kwekkeboom et al. 2008) et la radiothérapie métabolique est particulièrement bénéfique pour les TNE de grades 1 ou 2 progressives et/ou métastatiques (Baum, Puranik, et Kulkarni 2015).

Immunothérapie

Suite à l'essor des immunothérapies dans d'autres types de cancers, et à l'efficacité reconnue de l'IFN-α, l'immunothérapie est actuellement étudiée pour le traitement des NNE GEP.

Une étude récente menée chez 80 patients a démontré l'intérêt des biomarqueurs PD-1 (programmed death 1) et de son ligand PD-L1 (programmed death ligand-1) pour le pronostic des TNE pulmonaires (Fan et al. 2016). PD-1, exprimé à la surface des lymphocytes B et T, ainsi que sur les cellules myéloïdes, est aussi surexprimé sur les lymphocytes infiltrant les tumeurs (Y. Zhang et

al. 2010). PD-L1 est exprimé à la surface des cellules malignes dans différents types de tumeurs (Sfanos et al. 2009; Ahmadzadeh et al. 2009). L'interaction entre PD-1 et PD-L1 diminue l'activation des lymphocytes T du microenvironnement tumoral. Elle entraine l'apoptose des lymphocytes T et la sécrétion de cytokines favorisant l'immunosuppression dans le microenvironnement tumoral et augmente ainsi la multiplication des cellules tumorales (Freeman et al. 2000). Ainsi, l'inhibition de cette interaction va augmenter la réponse immunitaire contre les tumeurs.

L'immunothérapie avec les anti-PD1 et PDL1, prometteuse dans les carcinomes pulmonaires et les mélanomes, pourrait aussi avoir un intérêt dans les NNE GEP. Une forte expression de PD1/PDL1 dans les CNE peu différenciés (S. T. Kim et al. 2016) ou les CNE de primitif cutané (carcinomes de Merkel) a été retrouvée (Lipson et al. 2013). Un essai de phase II sur une cohorte de 26 carcinomes de Merkel métastatiques et naïfs de tout traitement a évalué le pembrolizumab, anti-PD1 (NCT02267603) (Nghiem et al. 2016). Le taux de réponse objective est de 56% (4 patients présentent une réponse complète et 10 une réponse partielle) et la survie sans progression à 6 mois s'élève à 67%. Parmi les 14 patients pour qui une réponse au traitement est observée, seuls 2 ont rechuté, et 15% des patients ont présenté des effets secondaires sévères. Dans l'étude de phase II JAVELIN Merkel 200 (NCT02155647) menée chez les patients atteints de carcinomes de Merkel ayant progressés après le dernier traitement par chimiothérapie et recevant l'aveluma, anti-PD1, un taux de réponse objective à 32%, dont 9% de réponse complète, et un taux de réponse à 6 mois de 29% ont été observés.

Une étude clinique de phase I/II est programmée afin d'évaluer la tolérance et l'efficacité clinique de la combinaison d'un inhibiteur de CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated protein), un régulateur clé de l'activité des lymphocytes T, et d'un inhibiteur de PD-1, le nivolumab, dans un ensemble de tumeurs, dont les tumeurs neuroendocrines pancréatiques, pulmonaires et intestinales (NCT02923934).

Il est donc nécessaire d'améliorer les connaissances sur le profil d'expression de nouvelles cibles comme PD1, au sein des NNE GEP et d'identifier s'il existe des différences de profil en fonction du grade ou de la localisation de la tumeur primitive. C'est ainsi que les patients répondeurs pour ce type de traitement pourront être sélectionnés et recevoir le traitement adapté.

2.8.5. Thérapies ciblées

Nous venons de voir les différentes thérapies disponibles pour traiter les NNE GEP. Cependant, ces traitement donnent des résultats limités : la nature peu prolifératives des TNE GEP les rendent peu sensibles à la chimiothérapie, et au contraire, la nature très agressive des CNE ne donne que peu de chance de survie, malgré une bonne réponse thérapeutique. Face à cette situation, les thérapies ciblées se sont développées, ciblant soit une voie de signalisation dérégulée, soit des facteurs de croissance ou des récepteurs surexprimés dans les tumeurs. A ce jour, les NNE GEP sont traitées par deux types de thérapies, l'une ciblant l'angiogenèse et l'autre ciblant la voie de survie mTOR.

Thérapies ciblées visant l'angiogenèse

Les TNE GEP bien différenciées sont des tumeurs présentant une densité vasculaire 10 à 20 fois plus importante que dans les autres types de tumeurs (Raymond, Faivre, et Ruszniewski 2014). Il est communément admis qu'une tumeur bien vascularisée reçoit plus de nutriments et d'oxygène, et sera donc susceptible de mieux proliférer qu'une tumeur faiblement vascularisée. Les TNE GEP constituent une exception sur ce point. En effet, la densité vasculaire est plus importante dans les TNE bien différencées, qui sont très peu prolifératives, que dans les CNE peu différenciés au contraire fortement prolifératifs (Scoazec 2013; A Couvelard et al. 2005; Poncet et al. 2009). A l'inverse des autres types tumoraux, une forte vascularisation est bénéfique pour le patient porteur d'un NNE GEP. Ainsi, pour les TNE pancréatiques, une plus forte densité vasculaire est associée à un meilleur pronostic (Marion-Audibert et al. 2003). Une autre particularité des TNE gastro-intestinales et pancréatiques est leur capacité à synthétiser, stocker et sécréter le facteur de transcription VEGF (Terris et al. 1998; A Couvelard et al. 2005).

Les CNE peu différenciés sont donc peu vascularisés : des zones d'hypoxie ainsi qu'une augmentation des marqueurs de la réponse cellulaire à l'hypoxie, comme les facteurs de transcription HIF1α et l'anhydrase carbonique IX sont retrouvées dans ces tumeurs (A Couvelard et al. 2005; Anne Couvelard et al. 2008). Ces différents facteurs provoquent une réponse angiogénique importante, avec une prolifération des cellules endothéliales et de la néoangiogenèse (Takahashi et al. 2007). Ainsi, contrairement aux TNE bien différenciées, les CNE expriment le VEGF de façon inconstante et hétérogène (Terris et al. 1998; A Couvelard et al. 2005).

Des études précliniques ont démontré que l'utilisation d'un anticorps anti-VEGF inhibait la croissance de TNE intestinales et réduisait le nombre de métastases dans un modèle murin de xénogreffe caecale de TNE intestinales humaines (Konno et al. 1998). Des essais cliniques ont donc été conduits avec le bévacizumab, un anticorps monoclonal ciblant le VEGF circulant, et des inhibiteurs de tyrosine kinase du VEGFR, comme le sunitinib, le sorafénib et le pazopanib.

- **Bévacizumab**

C'est un anticorps monoclonal IgG1 recombinant qui se lie au VEGF et inhibe son activité biologique. Une étude clinique de phase II a démontré une meilleure survie sans progression de l'association bévacizumab/octréotide comparée à celle de l'association IFN-α/octréotide, chez 44 patients atteints de TNE bien différenciées métastatiques (Yao, Phan, et al. 2008). L'étude BETTER (Bevacizumab in The Treatment of neuroEndocrine tumoRs) de phase II menée sur un groupe de 49 patients atteints de TNE gastro-intestinales bien différenciées, progressives et métastatiques a démontré l'efficacité clinique (taux de réponse objective de 88%, dont 70% de maladie stabilisée et 18% de réponse partielle) et la tolérance correct au traitement bévacizumab/capécitabine (précurseur du 5-fluorouracile) (Emmanuel Mitry et al. 2014). Ces résultats doivent à présent être confirmés dans une étude de phase III.

Le bévacizumab a également était testé en combinaison avec la chimiothérapie 5-fluorouracile/streptozocine dans un essai de phase II, sur un total de 34 patients atteints de TNE pancréatiques, bien différenciées, progressives et métastatiques. Il a été observé 100% de contrôle de la maladie (dont 56% de réponse partielle et 44% de maladie stabilisée). Après 2 ans de suivi des patients, la survie sans progression s'élevait à 23,7 mois. Le traitement était relativement bien toléré (Ducreux et al. 2014).

- **Sunitinib**

Le sunitinib est un inhibiteur de tyrosine-kinase des récepteurs 1, 2 et 3 du VEGF, mais également des récepteurs du PDGF (platelet-derived growth factor), des récepteurs cKIT (ou SCFR Mast/stem cell growth factor receptor), des récepteurs glial cell line-derived neurotrophic factor receptor et de la kinase Flt3 (FMS-like tyrosine kinase-3) (Mendel et al. 2003).

Dans des études précliniques, le sunitinib diminue la masse tumorale et prolonge la survie de souris transgéniques RIP1-Tag2 qui développent des CNE pancréatiques (Pietras et Hanahan 2005).

Son efficacité a été évaluée dans une étude de phase II, sur 109 patients présentant des TNE pancréatiques ou gastro-intestinales métastatiques (Kulke et al. 2008). Dans cette étude, une réponse partielle est constatée chez 16,7% des patients, et une stabilisation tumorale chez 68%. Ces résultats ont conduit à une étude de phase III, chez 171 patients porteurs de TNE pancréatiques progressives et métastatiques, évaluant l'efficacité du sunitinib versus placebo (Faivre et al. 2016). La survie sans progression différait significativement : 12,6 mois pour le bras sunitinib contre 5,8 mois pour le bras placebo. Cinq ans après la fin de l'étude, il n'y avait pas de différences significatives de survie globale, mais 69% des patients du groupe placebo avait finalement reçu du sunitinib. Cette étude confirme donc l'intérêt du sunitinib dans le traitement des TNE pancréatiques progressives.

Une étude portant sur la qualité de vie des patients ayant reçu du sunitinib montre que leur qualité de vie n'était pas altérée pendant la période de survie sans progression, mis à part les diarrhées qui sont un effet indésirable connu de ce traitement (Vinik et al. 2016).

Ce traitement possède l'AMM (autorisation de mise sur le marché) pour le traitement des TNE pancréatiques progressives, non résécables ou métastatiques.

- **Sorafénib**

Le sorafénib est aussi un inhibiteur de tyrosine-kinase des récepteurs 2 et 3 du VEGF, des récepteurs du PDGF, cKIT et Flt3. C'est aussi un inhibiteur de la voie de signalisation Raf/MEK/ERK (Wilhelm et al. 2004).

Sur le plan préclinique, le sorafénib induit l'apoptose des cellules tumorales et favorise la survie des souris RIP1-Tag2 développant des CNE pancréatiques (Fendrich et al. 2012).

En 2013, une étude de phase I a évalué la tolérance de cette molécule en association avec l'évérolimus, un inhibiteur de mTOR, sur 21 patients porteurs de TNE GEP métastatiques ou non résécables (J. A. Chan et al. 2013). Une importante toxicité avait alors été retrouvée (éruption cutanée, thrombocytopénie, réaction cutanée main-pied et réactions allergiques). Son efficacité a malgré tout été évaluée dans une étude de phase II sur 44 patients, en association avec le

bévacizumab (Castellano et al. 2013). L'association de ces deux molécules montrait un bénéfice clinique, mais confirmait également la toxicité retrouvée en monothérapie.

- **Pazopanib**

C'est un inhibiteur des récepteurs 1, 2, et 3 du VEGF, du PDGFR et du cKIT. Son efficacité est étudiée en monothérapie dans les TNE GEP métastatiques, dans une étude de phase II incluant 37 patients (Ahn et al. 2013). L'efficacité retrouvée était comparable aux autres inhibiteurs de tyrosine-kinases chez les TNE pancréatiques et gastro-intestinales.

En 2015, son efficacité est évaluée en association avec l'octréotide retard, chez 52 patients atteints de TNE métastatiques, dont 32 pancréatiques et 20 gastro-intestinales (Phan et al. 2015). Une réponse tumorale n'était retrouvée que chez les patients atteints de TNE pancréatiques, et le traitement était relativement bien toléré. Une autre étude de phase II a évalué l'efficacité du pazopanib en monothérapie dans le cas de TNE avancée ou métastatiques du pancréas, gastro-intestinales, pulmonaires ou du thymus déjà traitées ou non avec une chimiothérapie ou une thérapie ciblée (inhibiteurs de tyrosine-kinase, de mTOR ou les deux) sur un total de 44 patients (Grande et al. 2015). Cette étude rapporte un bénéfice clinique du pazopanib, peu importe le traitement antérieur reçu. Ces résultats doivent être confirmés dans des études de phase III.

Thérapies ciblant la voie mTOR

- **La voie mTOR**

La voie mTOR permet de réguler la croissance et la prolifération cellulaire. Elle est impliquée dans les maladies où la croissance est dérégulée et où l'homéostasie est compromise, comme le cancer, le diabète de type 2 et les maladies métaboliques. Elle est également impliquée dans les processus de vieillissement. mTOR est la cible de la molécule rapamycine (ou sirolimus), un macrolide produit par *Streptomyces hygroscopicus,* qui a d'abord attiré pour ses propriétés immunosuppressives (Laplante et Sabatini 2012). Il est utilisé aujourd'hui comme immunosuppresseur en entretien après une transplantation rénale. La compréhension de son mécanisme d'action et la mise en évidence de l'activation de la voie mTOR dans de nombreux cancers ont justifié son évaluation comme agent anti-cancéreux.

Structure de mTOR

mTOR est une sérine/thréonine kinase appartenant à la famille PI3K (phosphoinositide 3-kinase related protein kinases). Il existe sous forme de deux complexes : mTORC1 (mTOR Complexe 1) et mTORC2 (mTOR Complexe 2). Les deux complexes partagent certaines sous unités en communs (mTOR, mLST8 et DEPTOR), et d'autres sont spécifiques à l'un ou l'autre des complexes. mTORC1 possède en plus les sous-unités RAPTOR et PRAS40, tandis que mTORC2 est composé des sous-unités RICTOR, mSin1 et PRR5 (aussi appelé protor1) (Figure 5) (Appenzeller-Herzog et Hall 2012). Entre ces deux complexes, mTORC1 est à ce jour le mieux décrit et le plus documenté.

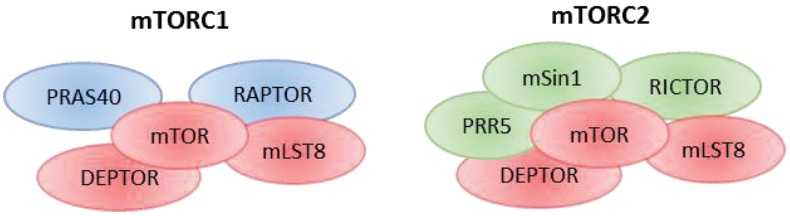


Figure 5 : Les complexes mTORC1 et mTORC2 et leurs sous-unités.

DEPTOR : DEP domain-containing mTOR-interacting protein ; mLST8 (ou GβL) : Mammalian lethal with SEC13 protein 8 (ou G protein β subunit-like) ; mSin1 : mitogen-activated-protein-kinase-associated protein 1 ; mTOR : mechanistic target of rapamycin ; PRAS40 : proline-rich Akt substrate of 40kDa ; PRR5 : PRoline-Rich protein ; RAPTOR : regulatory-associated protein of mTOR ; RICTOR : rapamycin-insensitive companion of mTOR.

Signalisation de la voie mTOR

La voie mTOR répond à une stimulation aux facteurs de croissance par la voie canonique PI3K/Akt/mTOR (Figure 6).

La fixation de l'insuline et des IGF (insulin-like growth factors) aux récepteurs à la surface cellulaire permet le recrutement et la phosphorylation de la protéine IRS1 (insulin receptor substrate1) sur un résidu tyrosine, puis le recrutement de PI3K. Le complexe IRS1/PI3K induit la conversion de PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-phosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-phosphate). Ce phénomène est réversible grâce à la phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10). Le gène codant pour cette protéine est un gène suppresseur de tumeur. PIP3 recrute PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) et Akt à la membrane, entrainant la phosphorylation d'Akt sur la thréonine 309 par PDK1. Ainsi activée, Akt phosphoryle TSC2 (Tuberous sclerosis complex 2 ou tuberine) le rendant inactif. Le complexe

normalement formé entre TSC1 (ou hamartine) et TSC2 régule négativement mTOR. En effet, TSC2 agit comme une protéine GAP (GTPase-activating protein) sur la protéine Rheb, qui est une petite protéine à l'activité GTPase, activateur essentiel de mTORC1. L'action de TSC2 sur Rheb la convertit en sa forme inactive liée au GDP, qui ne peut pas activer mTORC1. Quand TSC2 est rendu inactif par Akt, la forme active de Rheb liée au GTP peut interagir avec mTORC1 et stimuler son activité de protéine kinase de façon GTP-dépendante. mTORC1 ainsi phosphorylé active ensuite ses effecteurs (Laplante et Sabatini 2012; Wullschleger, Loewith, et Hall 2006). Les facteurs de croissance activent aussi la voie de signalisation Ras/MEK/ERK. Les protéines ERK (extracellular-signal-regulated kinase) et RSK (ribosomal S6 kinase), un effecteur de cette voie, peuvent phosphoryler directement TSC2, le rendant inactif (Laplante et Sabatini 2013).

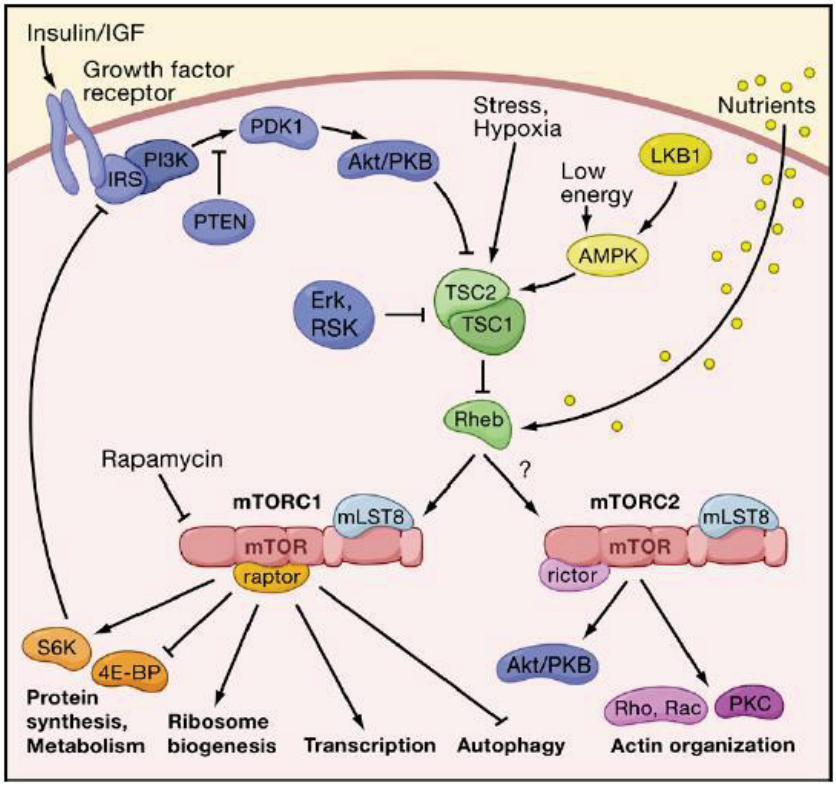


Figure 6 : Schéma des voies de signalisation mTORC1 et mTORC2 dans les cellules de mammifères.

Mécanismes cellulaires régulés par mTOR

Les substrats directs de mTORC1 sont 4E-BP1, S6K1, ATG13, ULK1 et Lipin 1. Par leur biais, mTORC1 régule positivement les processus de synthèse protéique, synthèse lipidique et le métabolisme énergétique, favorisant la croissance et la prolifération cellulaire, et il régule négativement l'autophagie (Figure 7).

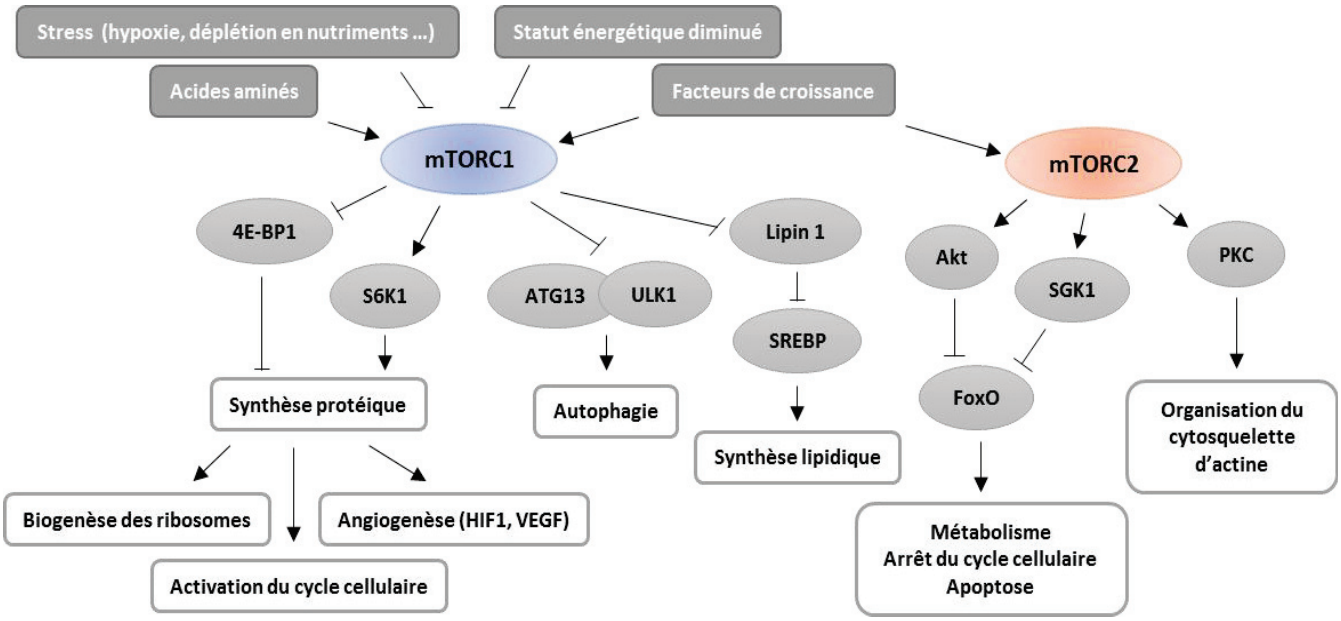


Figure 7 : Voies de signalisation mTORC1 et mTORC2, leurs régulateurs majeurs, leurs cibles et fonctions cellulaires.

En phosphorylant 4E-BP1 (eIF-4E binding protein 1), mTORC1 permet de lever l'inhibition de l'initiation de la traduction (X. M. Ma et Blenis 2009). mTORC1 phosphoryle également S6K1 qui favorise la traduction protéique et la biosynthèse des ribosomes. La transcription de HIF1α est augmentée par mTORC1, stimulant l'expression de gènes glycolytiques et de l'angiogenèse via un mécanisme encore inconnu. Une fois activée, la protéine S6K1 exerce un rétrocontrôle négatif sur IRS1, entrainant l'inhibition de la phosphorylation d'Akt, afin de réguler l'activation de la voie mTORC1 (Figure 6) (Haruta et al. 2000).

En phosphorylant les protéines ATG13 et ULK1, mTORC1 inhibe l'assemblage des autophagosomes, vésicules nécessaires au processus d'autophagie.

La synthèse lipidique est augmentée suite à l'activation de mTORC1, via la transcription de SREPB. La phosphorylation de Lipin 1 par mTORC1 l'empêche de rejoindre le noyau où Lipin 1 inhibe SREBP (Peterson et al. 2011).

Comparé à mTORC1, peu de choses sont connus sur mTORC2. mTORC2 phosphoryle la protéine Akt au niveau de la sérine 473, phénomène nécessaire pour son activation maximale (D. D. Sarbassov et al. 2005). Il active directement la kinase SGK1, qui contrôle le transport des ions et la

croissance (García-Martínez et Alessi 2008). Akt et SGK1 permettent la phosphorylation et l'inactivation du facteur de transcription FoxO1/3a (Forkhead box O1/3a), impliqué dans les mécanismes d'apoptose, dans l'arrêt du cycle cellulaire, dans la réponse aux espèces réactives de l'oxygène et dans le métabolisme (Tzivion, Dobson, et Ramakrishnan 2011). mTORC2 phosphoryle et active PKC, qui contrôle l'organisation du cytosquelette d'actine (Figure 7) (Laplante et Sabatini 2012).

Régulations de mTOR

Quatre régulateurs majeurs de mTORC1 sont aujourd'hui connus (Figure 7):

- les **facteurs de croissance**, qui régulent la voie canonique PI3K/Akt/mTOR, comme vu précedemment.

- les **nutriments**, et particulièrement les acides aminés, qui régulent la voie mTORC1 par les Rag GTPases (Ras-related GTPases) (E. Kim et al. 2008; Sancak et al. 2008). Les acides aminés favorisent la liaison du GTP aux RagA/B, les rendant actifs. Les Rag actifs vont ensuite interagir avec la sous-unité raptor, ce qui entraine le complexe mTORC1 à la surface des lysosomes et des endosomes. Rheb peut alors interagir avec mTORC1 et l'activer (Sancak et al. 2008). La perte de Rheb abolit l'activation de mTORC1 par les facteurs de croissance et les nutriments. Sa surexpression maintient mTORC1 activé, même en absence de nutriments ou facteurs de croissance (Zoncu, Efeyan, et Sabatini 2011).

- l'activation de mTORC1 est sensible au **statut énergétique** de la cellule, grâce à la protéine AMPK (AMP-activated protein kinase) (Figure 6). L'AMPK est activée en réponse à une diminution de l'énergie cellulaire disponible, soit un ratio AMP/ATP élevé. Lorsqu'elle est active, l'AMPK diminue les processus consommateur d'énergie, comme la synthèse protéique, et active les processus générateurs d'ATP, comme l'oxydation des acides gras. L'AMPK permet de phosphoryler directement TSC2, ce qui aura pour but d'inhiber l'activation de mTORC1 (Inoki, Zhu, et Guan 2003). Une étude a démontré que l'AMPK pourrait également directement phosphoryler Raptor, et entrainer sa dissociation du complexe mTORC1 (Gwinn et al. 2008). Le suppresseur de tumeur LKB1 est une kinase située en amont d'AMPK. Il est capable de phosphoryler et d'activer AMPK, conduisant à l'inactivation de mTORC1 (Shaw 2009).

- les cellules réagissent aussi au **stress environnemental** provoqué par l'hypoxie, en inhibant la voie mTORC1, en diminuant les processus cellulaires consommant trop d'énergie et en stoppant la croissance cellulaire. L'hypoxie est perçue par les protéines REDD1 et REDD2 (regulated in development and DNA damage responses 1 and 2). En effet, l'expression de ces protéines est augmentée par le facteur de transcription HIF1 (Brugarolas et al. 2003). Le mécanisme d'inhibition de mTORC1 par REDD est mal connu.

- les dommages à l'ADN modulent aussi la voie mTORC1. Ils activent p53, ce qui va induire la voie AMPK/TSC2 responsable de l'inhibition de mTORC1 (Z. Feng et al. 2007).

Les régulateurs du complexe mTORC2 sont moins connus. La voie mTORC2 est régulée par les facteurs de croissance, en activant la voie PI3K. A l'inverse de mTORC1, mTORC2 est insensible à la disponibilité en nutriments. Le mécanisme d'activation de mTORC2 est encore mal connu. L'un d'eux impliquerait les ribosomes, car il a été démontré que le complexe mTORC2 actif interagissait physiquement avec le ribosome et que l'activation de la voie par les facteurs de croissance provoque la liaison mTORC2/ribosome (Zinzalla et al. 2011).

Une fois la voie mTOR active, elle peut s'autoréguler par différents mécanismes de rétrocontrôle négatif, afin d'atténuer sa propre activation (Figure 6). L'un des effecteurs de mTORC1, S6K1, phosphoryle la protéine IRS1 sur un résidu sérine, ce qui favorise sa dégradation et bloque toute activation de la voie IRS1/PI3K par des facteurs de croissance. mTORC1 peut aussi directement phosphoryler IRS1, bloquant l'activation de la voie, ou il peut phosphoryler une protéine inhibitrice des récepteurs à tyrosine-kinase, Grb10 (Growth factor receptor-bound protein 10) (Laplante et Sabatini 2012). Enfin, des études ont démontré que le complexe mTORC2 pouvait également induire un rétrocontrôle négatif sur la voie mTOR, via la dégradation d'IRS1 (DeStefano et Jacinto 2013).

- **Intérêt de cibler la voie mTOR dans les NNE GEP**

Une dérégulation de la voie mTOR a été identifiée dans de nombreux cancers. Il existe des syndromes de prédisposition génétique provenant de mutations de gènes codant pour des

régulateurs négatifs de mTOR comme TSC1/2, LKB1 ou PTEN, entrainant alors l'activation constitutive de mTOR. Cela permet une synthèse accrue de protéines pro-tumorales comme les régulateurs du cycle cellulaire et les facteurs pro-angiogéniques. L'activation constitutive de mTORC1 peut aussi favoriser la tumorigenèse en inhibant l'autophagie et en favorisant la synthèse lipidique.

mTORC2 peut aussi favoriser la tumorigenèse en activant ses substrats Akt, et SGK1, qui vont favoriser le métabolisme et la prolifération cellulaire (Laplante et Sabatini 2012; Zoncu, Efeyan, et Sabatini 2011).

La voie mTOR est aussi altérée dans les TNE pancréatiques et gastro-intestinales, avec respectivement 14% et 33% de mutations de gènes de la voie mTOR retrouvés après séquençage du génome entier (Jiao et al. 2011; Banck et al. 2013). Une autre étude réalisée sur 72 échantillons de TNE pancréatiques a démontré la présence d'une diminution d'expression des gènes *Tsc2* dans 37% des cas, et *Pten* dans 10 à 29% des cas (Missiaglia et al. 2010). La diminution d'expression de ces gènes inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR entraine sa suractivation. L'analyse immunohistochimique a confirmé une diminution de l'expression de TSC2 au niveau cytoplasmique chez 35% des patients et une diminution de l'expression de PTEN au niveau nucléaire et/ou cytoplasmique dans environ 60% des cas (Missiaglia et al. 2010). Cette perte d'expression est corrélée à une plus forte agressivité tumorale, à un index de prolifération plus élevé, à la présence de métastases hépatiques et enfin à un temps jusqu'à progression plus court.

Qian *et al.* ont confirmé qu'une faible expression de TSC1 et TSC2 est communément retrouvée dans les TNE pancréatiques, et qu'une forte expression des protéines de la voie mTOR comme Akt, phospho-RPS6KB1 ou phospho-RPS6 est plus commune dans les TNE de l'intestin grêle, sur 195 échantillons de TNE GEP (Qian et al. 2013). Cette étude démontre que l'expression de phospho-RPS6KB1 ou de phospho-RPS6 est associée à une plus courte survie globale après analyse multivariée.

Une étude sur les CNE GEP a évalué les biomarqueurs moléculaires de la voie mTOR (phospho-mTOR, phospho-eIF4E et phospho-4EBP1). Une forte expression de ces marqueurs a été retrouvée et elle est corrélée à une survie plus courte, montrant que la voie mTOR joue aussi un rôle dans la croissance tumorale des CNE GEP (Catena et al. 2011; Maximilian Heetfeld et al. 2013).

Les résultats de ces différentes études montrent l'activation de la voie mTOR dans les NNE GEP. Cette activation est associée à un moins bon pronostic. La voie mTOR est donc une potentielle cible thérapeutique, et des molécules inhibitrices ont été développées. La partie suivante porte sur les inhibiteurs de mTOR utilisés dans le traitement des NNE GEP.

- **Les inhibiteurs de mTOR**

Au niveau préclinique, le premier inhibiteur de mTOR étudié a été la rapamycine (ou sirolimus), un inhibiteur allostérique de mTORC1 qui se lie et inhibe la protéine FKBP-12 (FK506-binding protein 12). Le complexe rapamycine/FKBP-12 formé interagit avec mTORC1 et permet de prévenir la propagation du signal (Shimobayashi et Hall 2014). La rapamycine réduit le développement et la progression tumorale dans un modèle murin de suractivation de la voie mTOR (avec une mutation *PTEN*$^{+/-}$) (Podsypanina et al. 2001). Des résultats similaires ont été obtenus avec des modèles murins de NNE GI pour lesquels la rapamycine ou l'évérolimus (un analogue de la rapamycine) induisent des effets anti-tumoraux *in vitro* et *in vivo* mais également une diminution de l'expression du VEGF (Villaume et al. 2010; Couderc et al. 2011; Bollard et al. 2013).

Les premiers essais cliniques qui ont évalué l'efficacité de l'inhibition de la voie mTOR dans les NNE ont utilisé le temsirolimus, pro-drogue de la rapamycine. Chez des patients porteurs de TNE non résécables, seuls 5,6% des patients ont présenté une réponse objective (Duran et al. 2006). L'évérolimus a ensuite été évalué, dans une première étude de phase II chez 160 patients atteints de TNE pancréatiques métastatiques réfractaires aux chimiothérapies (étude RADIANT-1) (Yao et al. 2010). Le taux de réponse objective s'élevait à 8,7% mais 84,7% des patients présentaient une stabilité tumorale. La médiane de survie globale dans le groupe évérolimus + octréotide n'était pas encore atteinte le jour de la publication de l'article, et s'élevait à 24,9 mois dans le groupe évérolimus seul. Ces résultats ont conduit à la mise en place de 3 études randomisées multicentriques de phase III (RADIANT-2, -3 et -4).

L'étude RADIANT-2 a évalué l'effet de l'association évérolimus/octréotide comparé à l'octréotide seul, sur 429 patients présentant une TNE bien différenciée métastatique (M. E. Pavel et al. 2011). Une réduction du risque de progression tumorale de 23% a été observée lors du traitement par évérolimus.

L'étude RADIANT-3 a été menée chez 410 patients porteurs de TNE pancréatiques non résécables ou métastastiques, n'ayant jamais reçu un inhibiteur de mTOR. Elle a confirmé l'effet bénéfique de l'évérolimus sur la survie sans progression (Yao et al. 2011) qui s'élève à 11 mois pour le groupe traité par évérolimus, contre 4,6 mois pour le groupe placebo. Les taux de réponses objectives retrouvées étaient bas pour les deux groupes (5 et 2%). En revanche, 73% des patients recevant l'évérolimus ont présenté une stabilisation de la tumeur, contre 51% pour le groupe placebo. 14% des patients n'ont pas répondu à l'évérolimus et ont présenté une progression tumorale, contre 42% de progression tumorale pour le groupe placebo. En termes de survie globale, aucune différence significative n'a été retrouvée entre les groupes car 73% des patients du groupe placebo avaient reçu le traitement par évérolimus suite à une progression de la maladie.

Enfin, l'étude RADIANT-4 a comparé l'efficacité de l'évérolimus *versus* placebo chez 302 patients atteints de TNE non fonctionnelles, progressives ou métastatiques, d'origine pulmonaire ou gastro-intestinale (Yao et al. 2016). Comparativement à l'étude RADIANT-3, la médiane de survie sans progression du groupe traité par évérolimus s'élevait à 11 mois et celle du groupe placebo à 3,9 mois. Cette étude a permis de démontrer l'efficacité de l'évérolimus dans les TNE progressives du poumon et gastro-intestinales, en plus des TNE pancréatiques.

Deux études de phase II évaluant l'évérolimus dans les CNE GEP sont en cours en Allemagne et en Europe du nord, soit en monothérapie (NCT02113800), soit associé au temozolomide, chez des patients atteints d'un CNE GEP métastatiques dont le Ki-67 se situe entre 20 et 55 % (NCT02248012).

L'évérolimus est généralement bien toléré, les effets indésirables les plus fréquemment décrits étant une stomatite, un rash cutané, une asthénie, des épisodes infectieux, une toxicité pulmonaire. Les toxicités de grade 3-4 développées étaient une anémie ou une hyperglycémie (Yao et al. 2016).

L'utilisation de l'évérolimus est approuvée depuis 2011 pour le traitement des TNE pancréatiques, progressives ou métastatiques et non résécables. Des autorisations hors AMM sont possibles afin de l'utiliser dans d'autres cas particuliers. La FDA a approuvé l'utilisation de l'évérolimus pour les TNE non fonctionnelles, progressives ou métastatiques, d'origine pulmonaire ou gastro-intestinale en février 2016.

- **Phénomènes de résistances aux inhibiteurs de mTOR**

Le traitement par évérolimus ne permet pas d'augmenter la survie globale des patients dans les deux études de phase III menées sur les TNE pancréatiques, gastro-intestinales et pulmonaires mais il permet une stabilisation de la tumeur (Yao et al. 2011; Yao et al. 2016), suggérant l'existence de phénomènes d'échappement. De plus, certains patients ne répondent pas à ce traitement. Ces phénomènes de résistances peuvent s'expliquer par différents mécanismes.

L'évérolimus, inhibiteur allostérique de mTORC1, provoque la perte du rétrocontrôle négatif de la protéine S6K1 sur IRS1. Cela réactive les voies PI3K/Akt/mTORC1 (Sun et al. 2005) et Ras/Raf/MEK/ERK (Carracedo et al. 2008) et favorise à nouveau la prolifération cellulaire (Figure 8B). Les résistances peuvent provenir également de mutations de gènes codant pour des protéines de la voie mTOR, rendant les cellules insensibles aux inhibiteurs allostériques de mTOR.

Dans ce contexte, des inhibiteurs de mTOR et de PI3K ont été développés afin de palier au phénomène de réactivation de la voie via l'induction de PI3K (Figure 8D). Une des molécules développées est NVP-BEZ235, un inhibiteur des quatre classes d'isoformes de PI3K et des complexes mTORC1 et mTORC2. Les résultats précliniques sur les lignées cellulaires humaines de TNE pancréatiques BON1, intestinales GOT1 et bronchiques NCI-H727 ont montré une efficacité sur l'inhibition de la croissance cellulaire (Zitzmann et al. 2010). Elle inhibe l'activation d'Akt retrouvée après le traitement à l'évérolimus. Cette étude a également démontré que la combinaison de l'évérolimus au NVP-BEZ235 était plus efficace que le traitement avec l'une ou l'autre de ces molécules.

Vandamme *et al.* ont confirmé l'efficacité de cette molécule sur deux lignées cellulaires de TNE pancréatiques humaines BON1 et QGP-1 rendues résistantes aux rapalogues (Vandamme et al. 2016). Ces cellules ont été traitées plus de 20 semaines avec des concentrations croissantes d'éverolimus (de 1 nM à 1 µM), développant une résistance à l'éverolimus mais aussi aux autres rapalogues. NVP-BEZ235 a inhibé la prolifération cellulaire des cellules sensibles et des cellules résistantes à l'évérolimus. L'analyse de l'expression des gènes de la voie mTOR dans les cellules BON1 résistantes à l'évérolimus a révélé une diminution d'expression des gènes *MTOR*, *RICTOR*, *RAPTOR*, *Akt* et *HIF1A* et une augmentation de l'expression du gène *4EBP1*. Dans les cellules QGP-1 résistantes à l'évérolimus, une diminution d'expression du gène *HIF1A* et une augmentation d'*ERK2*

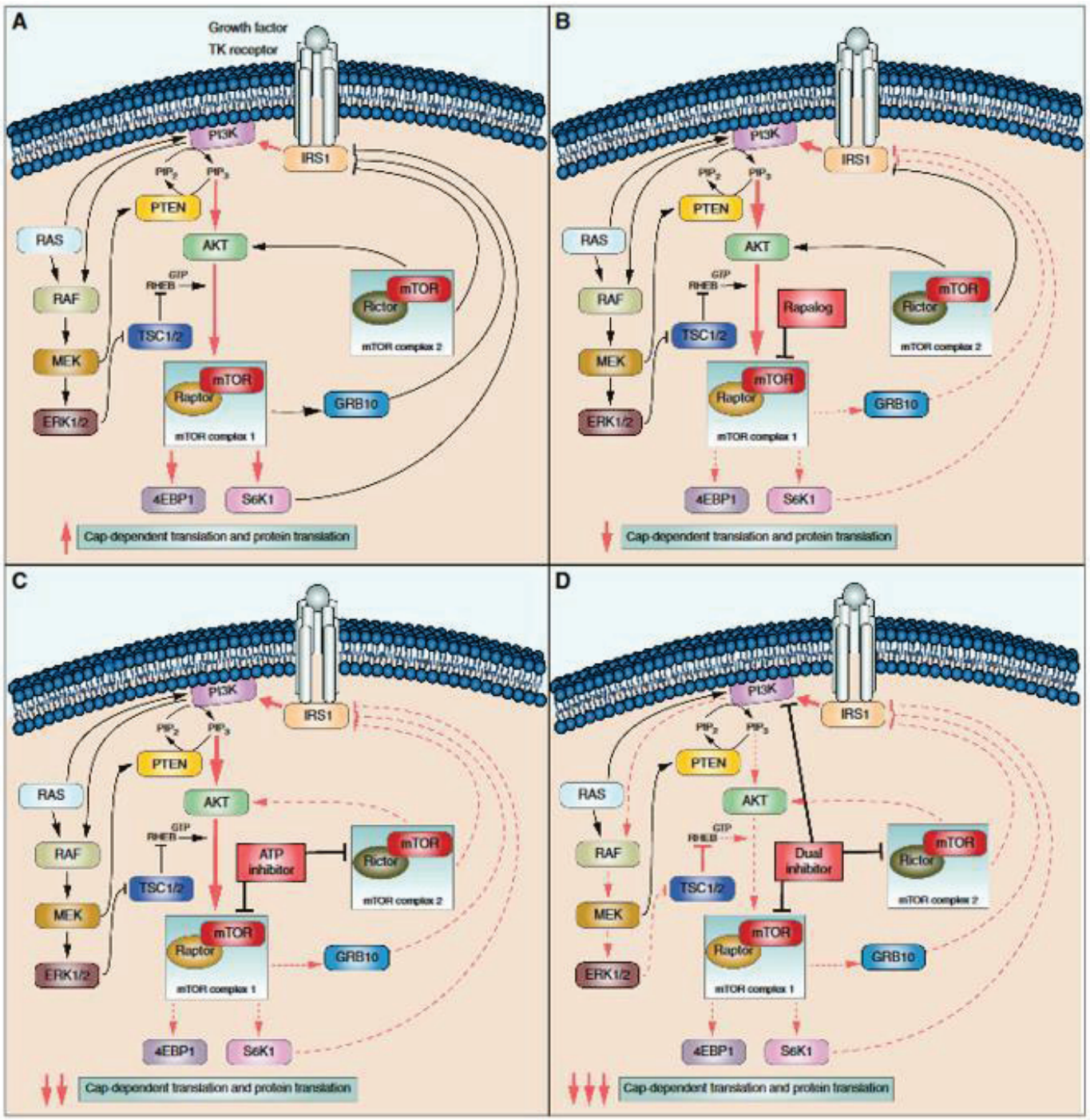


Figure 8 : Représentation schématique des effets d'inhibiteurs de mTOR sur la voie mTOR.

A : Les flèches rouges représentent l'activation de la voie IRE1/PI3K/Akt/mTORC1 et l'activation des 2 effecteurs principaux de mTORC1, S6K1 et 4E-BP1, augmentant la synthèse protéique (entre autres). Le schéma représente aussi l'activation de la voie RAF/MEK, permettant d'activer PTEN ou d'inhiber le complexe TSC1/TSC2. L'activation du complexe mTORC2 permet l'activation de la kinase Akt. Trois voies de rétrocontrôle négatif sont représentées : l'inhibition d'IRS1 par S6K1, GRB10 (Growth factor receptor bound protein 10) et mTORC2.

B : Action des inhibiteurs allostériques de mTOR (ou rapalogues) inhibant de l'activation des effecteurs de mTORC1, S6K1, 4E-BP1 et GRB10. Il en résulte une diminution de la traduction protéique. Cette inhibition permet de lever le rétrocontrôle de S6K1 et de GRB10 sur IRS1 (lignes pointillées rouges), permettant de réactiver la voie mTORC1 (flèches rouges).

C : Effets des inhibiteurs compétitifs du site de liaison à l'ATP de mTORC1 et mTORC2. Ces molécules inhibent l'activation des complexes mTORC1 et mTORC2, diminuant la synthèse protéique et l'activation d'Akt par mTORC2 (flèches en pointillée rouges). Ces molécules lèvent le rétrocontrôle exercé par S6K1, GRB10 et mTORC2 (lignes pointillées rouges), ce qui réactive la voie mTORC1 via IRS1 (flèches rouges).

D : Effet des inhibiteurs de PI3K, mTORC1 et mTORC2. Suite à l'action de ces molécules, la voie mTORC1 est inhibée, réduisant la synthèse protéique, mais levant le rétrocontrôle de S6K1 et GRB10 sur IRS-1. La voie mTORC2 est inhibée également, ce qui lève son rétrocontrôle sur IRS1, mais la réactivation de mTORC1 qui s'en suit est empêchée par l'inhibition de PI3K. D'après Vandamme et al. 2016.

ont été observées. Ces variations de l'expression génique de la voie mTOR pourraient expliquer la résistance de ces cellules à l'évérolimus.

Le développement clinique de cette molécule a dû être prématurément interrompu après les études de phase II, du fait d'une mauvaise tolérance au traitement. Par ailleurs, il a été observé une meilleure efficacité du traitement par évérolimus comparé au NVP-BEZ235 (Fazio 2015; Salazar et al. 2015). Malgré l'efficacité démontrée au cours des études précliniques, le NVP-BEZ235 n'a pas eu l'effet escompté chez les patients porteurs de TNE pancréatiques.

DEUXIEME PARTIE – STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET CANCER

1. Le stress du réticulum endoplasmique et la réponse UPR

1.1. Généralités sur le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite cellulaire présent uniquement dans les cellules eucaryotes. Le RE est un réseau membranaire en continuité avec la membrane externe du noyau. Il est organisé en cavités (ou citernes) reliées entre elles et en relation avec les autres organites de la cellule comme la mitochondrie ou l'appareil de Golgi. Il a été observé pour la première fois en 1945 par microscopie électronique par Ernest Fullam, Keith Porter et Albert Claude (Porter, Claude, et Fullam 1945). Le RE représente plus de 50% des membranes d'une cellule. Cet organite est dit multifonctionnel, car il joue un rôle central dans plusieurs processus cellulaires comme la synthèse des protéines, leur maturation et leur repliement, les modifications post-traductionnelles protéiques, la synthèse du cholestérol, des stéroïdes et des phospholipides membranaires et le maintien de l'homéostasie calcique (Rutkowski et Kaufman 2004). Il existe deux types de RE. Le RE rugueux, caractérisé par la présence de ribosomes à la surface externe de sa membrane, où se déroulera principalement la synthèse, les modifications post-traductionnelles et le repliement des protéines membranaires ou destinées à être secrétées. C'est aussi la réserve majeure de calcium intracellulaire. Le RE lisse, qui est dépourvu de ribosomes et qui possède une organisation tubulaire, participe à la synthèse des lipides (cholestérol, stéroïdes, phospholipides…) et au stockage du calcium intracellulaire.

Seules les protéines membranaires ou destinées à être sécrétées transitent par le RE. Elles représentent environ un tiers des protéines synthétisées par la cellule. Le repliement dépend d'une régulation étroite du niveau d'oxydation, nécessaire à la formation de ponts disulfures. Ces ponts stabilisent la conformation des protéines matures (A. S. Lee 1992). De ce fait, le repliement des protéines est très sensible aux variations de l'environnement. Ces variations peuvent être internes au RE (survenant dans la lumière du RE) : altération de la concentration calcique ou du statut d'oxydo-réduction, augmentation de la synthèse protéique (entrainant un afflux de protéines dans la lumière du RE), ou d'origine externe : modification du statut énergétique ou stimuli pathogènes ou inflammatoires. Ces différentes conditions peuvent entrainer l'altération du repliement des protéines et leur accumulation dans le RE. Elles vont rompre ce que l'on nomme l'équilibre homéostatique du RE et entraîner un stress du RE (ou SRE).

1.2. Le stress du réticulum endoplasmique

Le SRE se définit comme toutes les conditions pour lesquelles la capacité du RE à exercer une ou plusieurs fonction(s) est dépassée, ce qui peut être délétère pour la cellule si elle n'arrive pas à rétablir l'homéostasie du RE.

Ces évènements ont pour conséquence l'activation d'un ensemble de voies de signalisation en réponse au SRE, appelé UPR (Unfolded Protein Response) (L. Ozcan et Tabas 2012). Cette réponse adaptative au SRE est induite dans le but de rétablir et maintenir l'homéostasie du RE, d'arrêter la division cellulaire et d'assurer ainsi la survie de la cellule (Y. Ma et Hendershot 2004). Néanmoins, il arrive que la cellule ne réussisse pas à rétablir son homéostasie, notamment lors d'un stress prolongé ou trop intense. La réponse UPR induit alors la mort cellulaire par apoptose.

Nous verrons tout d'abord les inducteurs connus du SRE puis les trois voies de l'UPR seront détaillées.

1.2.1. Les inducteurs du SRE

Les facteurs inducteurs d'un SRE peuvent être intrinsèques ou extrinsèques aux cellules, physiologiques ou pathologiques.

Chez les mammifères, le SRE a été détecté dans les cellules sécrétrices de protéines, comme les cellules β-pancréatiques, qui synthétisent et sécrètent de l'insuline en grande quantité, ou comme les plasmocytes, sécrétant les immunoglobulines (Moore et Hollien 2012). Dans ces conditions de synthèse protéique accrue (que ce soit l'insuline en réponse à une hyperglycémie, ou les anticorps en réponse à une infection par exemple), l'homéostasie du RE va être perturbée par l'arrivée massive au sein du RE de protéines destinées à être sécrétées. Le RE activera donc l'UPR en réponse à cette accumulation physiologique de protéines. Ainsi, l'augmentation de la synthèse protéique globale nécessaire aux fonctions sécrétrices, à la prolifération cellulaire ou au développement est un facteur de SRE.

Le SRE peut aussi être activé dans des conditions pathologiques. Les infections virales sont activatrices du SRE. Le virus détourne la machinerie cellulaire de sa cellule hôte à son propre profit, afin de pouvoir se multiplier. Il utilise les capacités de synthèse protéique de la cellule, afin de produire suffisamment de protéines virales qui formeront les nouveaux virus. Cela peut engendrer un SRE si les capacités de production du RE sont dépassées (Kaufman 2002).

Les maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, se caractérisent par une phosphorylation excessive et une agrégation anormale de la protéine Tau. Une activation du SRE a été retrouvée dans les neurones de patients souffrant de cette maladie (van der Harg et al. 2014).

Des mutations génétiques modifiant la structure des protéines sécrétées peuvent être à l'origine d'un SRE. Par exemple, dans le modèle génétique de souris diabétique Akita, une mutation du gène codant pour l'insuline conduit à la formation d'une proinsuline de structure tridimensionnelle différente qui s'accumule dans le RE, et qui déclenche un SRE (Araki, Oyadomari, et Mori 2003). Le SRE est également retrouvé dans le diabète. Une perte de fonction d'une protéine « senseur » de l'UPR, la kinase PERK, conduit au syndrome de Wolcott-Rallison, caractérisé par un diabète juvénile (Delépine et al. 2000). Une mutation touchant une protéine régulant le calcium intracellulaire, la wolframine, est impliquée dans la survenue d'un diabète juvénile. Cette maladie est connu sous le nom de syndrome de Wolfram (Inoue et al. 1998). Les altérations de l'homéostasie du RE dans les cellules β-pancréatiques conduisent donc à un diabète sévère.

Des altérations du microenvironnement cellulaire peuvent déclencher un SRE. Une privation des cellules en glucose perturbe deux fonctions du RE : la glycosylation des protéines et le fonctionnement des protéines chaperons dont l'activité enzymatique dépend de la présence d'ATP (Kaufman 2002). L'hypoxie perturbe l'environnement oxydatif, nécessaire à l'établissement des ponts disulfures stabilisateurs de la structure des protéines (D. E. Feldman, Chauhan, et Koong 2005). Un manque d'oxygène inhibe également la production d'ATP par la chaîne respiratoire, perturbant l'activité enzymatique des protéines chaperons qui n'exercent plus leur fonction (Cantor et Sabatini 2012).

Enfin, il est également possible de déclencher expérimentalement un SRE grâce à différents composés chimiques. La thapsigargine induit l'ouverture des canaux calciques et la libération du calcium du RE vers le cytosol, perturbant l'équilibre calcique du RE et le repliement des protéines. En effet, le fonctionnement des protéines chaperons (BiP, Grp94 et la calréticuline) est dépendant du calcium. La tunicamycine inhibe l'enzyme DPAGT1 nécessaire pour les modifications post-traductionelles, notamment les N-glycosylations des protéines. Le DTT (DiThioThréitol) inhibe la formation des ponts disulfures, et le 2-déoxyglucose bloque le métabolisme du glucose (Kaufman 1999).

De nombreuses autres molécules modulant la réponse UPR sont actuellement en cours d'essais cliniques (discuté § 5. L'UPR comme cible thérapeutique anti-cancéreuse).

1.2.2. Les 3 voies de l'UPR

L'UPR a initialement été décrit chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans les années 1990, où il se limite à l'activation d'une seule voie, la voie IRE1, et à un facteur de transcription Hac1, dans le but d'activer des gènes cibles codant pour les protéines chaperons du RE, les protéines de glycosylation et les protéines de la voie de dégradation des protéines mal repliées ERAD (ER-associated protein degradation) (Nikawa et Yamashita 1992; Cox, Shamu, et Walter 1993).

Chez les mammifères, l'activation de l'UPR est médiée par 3 voies de signalisation dont les protéines « senseurs » du SRE se situent au niveau de la membrane du RE. A ce jour, 3 protéines « senseurs » ont été identifiées : PERK (PKR-like ER kinase), IRE1 (Inositol requiring enzyme 1) et ATF6 (Activating transcription factor-6 protein). Leur partie luminale permet d'intégrer les informations provenant de la lumière du RE, et leur partie cytoplasmique effectrice permet d'interagir avec les effecteurs de la transcription ou de la traduction (Figure 9).

A l'état normal, les protéines chaperons BiP (Binding immunoglobulin Protein) également appelées Grp78 (Glucose-Regulated Protein 78kDa), situées dans la lumière du RE, interagissent avec le domaine luminal des protéines « senseurs » du SRE afin de les maintenir inactives. En présence d'un SRE, deux évènements clés se produisent (Figure 10). D'une part, BiP se lie aux protéines mal conformées dans la lumière du RE, afin d'aider au repliement des protéines. D'autre part, la liaison entre BiP et les protéines « senseurs » du SRE se rompt, levant l'effet inhibiteur de BiP (Bertolotti et al. 2000; Shen et al. 2002). Il a été démontré chez la levure que les protéines mal conformées pouvaient directement interagir avec IRE1 et déclencher son activation (Gardner et Walter 2011). Ce modèle d'activation n'a pas été décrit chez les mammifères.

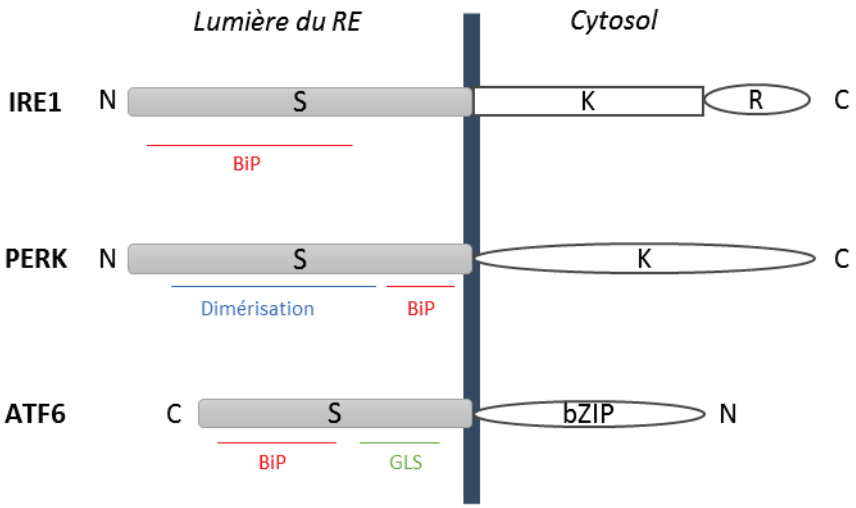


Figure 9 : Représentation schématique des 3 protéines de l'UPR : IRE1, PERK et ATF6.

Ligne rouge : région de liaison à BiP ; ligne bleue : région de dimérisation de PERK ; ligne verte : région nécessaire à la translocation vers l'appareil de Golgi (GLS, Golgi localization signal) ; S : Domaine luminal « senseur » ; K : domaine Ser/Thr kinase ; R : domaine endoribonucléasique ; bZIP : facteur de transcription contenant le domaine basic leucine zipper ; N : extrémité N-terminale ; C : extrémité C-terminale.

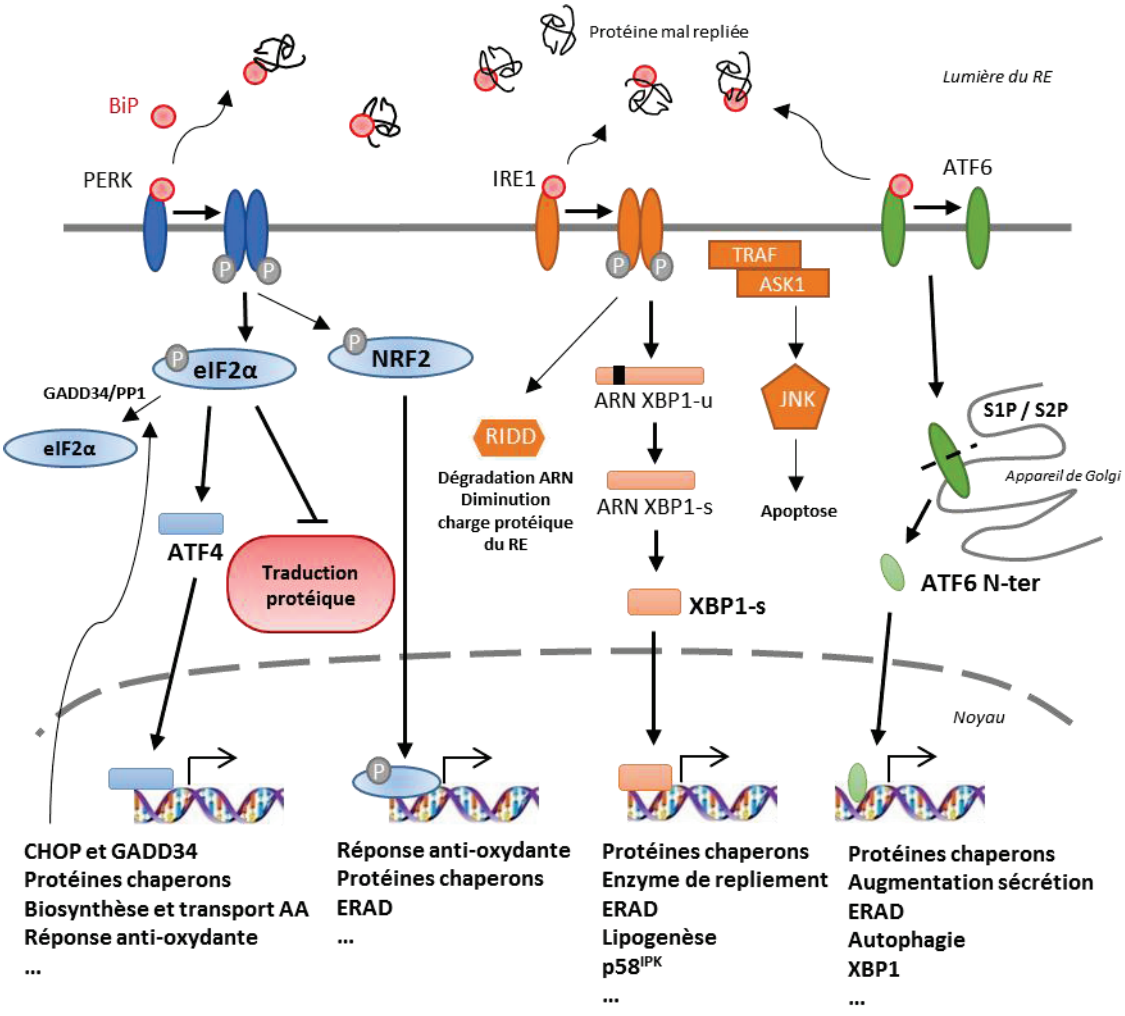


Figure 10 : Représentation schématique des 3 voies de l'UPR : PERK, IRE1 et ATF6.

La voie PERK

PERK est un senseur transmembranaire de type 1 dont la taille est comprise entre 130 et 150 kDa en fonction de sa phosphorylation. Elle possède une activité enzymatique sérine/thréonine (Ser/Thr) kinase au niveau de son domaine cytosolique (Figure 9). La dissociation de BiP du domaine luminal provoque la dimérisation et l'autophosphorylation de PERK au niveau de la thréonine 981, activant la kinase (Figure 10) (Bertolotti et al. 2000). Le substrat principal de PERK est eIF2α, un facteur d'initiation de la traduction. PERK phosphoryle eIF2α sur la sérine 51, permettant de bloquer la traduction cap-dépendante, en inhibant la formation du complexe tertiaire d'initiation de la traduction (eIF2/GTP/Met/tRNAi). Le flux entrant de protéines dans le RE est ainsi réduit, pour éviter une surcharge du RE en condition de stress (Koromilas 2015).

Parallèlement à l'inhibition transitoire de la traduction, celle de certains ARNm est au contraire favorisée. C'est le cas de l'ARNm d'ATF4 (activating transcription factor 4), de CHOP (C/EBP homologous protein) ou de GADD34 (Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34) (Pavitt et Ron 2012). Ces ARNm possèdent des cadres de lecture ouverte (ou uORF pour upstream open reading frame) dans la région 5' non traduite (5'-UTR), qui favorisent la traduction lors de l'inhibition de complexe tertiaire. La traduction d'ATF4 augmente et la protéine est adressée au noyau pour exercer son activité de facteur de transcription. ATF4 se fixe sur l'élément de réponse CARE (C/EBP [CCAAT-enhancer-binding protein]-ATF-responsive element) de ses gènes cibles (ASNS, CAT1, CHOP, TRB3, …) (Ameri et Harris 2008). L'expression de ses gènes cibles, impliqués dans la biosynthèse et le transport des acides aminés, la biosynthèse des protéines chaperons du RE et dans la réponse anti-oxydante est augmentée. Cela permet de restaurer l'homéostasie du RE et de promouvoir la survie des cellules (Jiangbin Ye et al. 2010).

Si l'homéostasie du RE n'est pas rétablie, ou lors d'un SRE prolongé, ATF4 induit l'expression du facteur pro-apoptotique CHOP, qui va réprimer l'expression de Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) et déclencher l'apoptose grâce à l'action des protéines pro-apoptotiques Bax et Bad (Sano et Reed 2013).

CHOP permet d'activer GADD34, une protéine activatrice de la protéine phosphatase 1 (PP1) qui déphosphoryle phospho-eIF2α. Ce rétrocontrôle négatif permet de réguler eIF2α et rétablir la synthèse protéique (Connor et al. 2001). Lors d'un stress prolongé, l'effet pro-apoptotique de CHOP est accentué par l'augmentation de la charge protéique du RE, car GADD34 favorisera la reprise de la synthèse protéique (Marciniak et al. 2004).

La voie eIF2α/ATF4/CHOP fait partie d'une voie adaptative suite à un stress, que l'on nomme Integrated Stress Response (ISR). Cette voie peut être activée par 3 autres kinases en plus de la kinase PERK : PKR (protein kinase R), HRI (heme-regulated inhibitor) et GCN2 (gene control non-derepressible-2). Chaque kinase s'active suite à différents stress physiologiques ou environnementaux. PKR est principalement activé par à la détection d'ARN double brins, suite à une infection virale. HRI, principalement exprimé dans les érythrocytes, s'active lors d'un épuisement du cofacteur hème. GCN2 est activée par la déplétion extracellulaire en acides aminés (Pakos-Zebrucka et al. 2016).

Un autre substrat de PERK est le facteur de transcription NRF2 (NF-E2-related factor 2) (Cullinan et al. 2003). Dans des conditions normales, NRF2 interagit avec la protéine KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) qui le maintient dans le cytosol. Suite au SRE, NRF2 est libéré de KEAP1 et il est phosphorylé par PERK. Il rejoint le noyau et se fixe aux séquences ARE (Antioxydant response element) de ses gènes cibles tels que GCLC (Glutamate cystein ligase catalytic subunit), HO-1 (Heme oxygenase 1) ou NQO1 (NAD(P)H dehydrogenase quinone 1) (Cullinan et Diehl 2004). L'activation de NRF2 par PERK joue un rôle dans le maintien du statut redox de la cellule lorsqu'elle est soumise à un SRE.

La voie IRE1

IRE1 est une protéine transmembranaire de type 1 du RE de 110 kDa possédant deux activités enzymatiques au niveau de son domaine cytosolique : une activité Ser/Thr kinase et une activité endoribonucléase. Il existe chez les mammifères deux isoformes α et β, la première étant exprimée de façon ubiquitaire, la seconde n'étant exprimée que dans les cellules épithéliales de l'intestin. La dissociation de BiP permet la dimérisation d'IRE1 puis son auto-phosphorylation (Prischi et al. 2014). Actuellement, deux voies de signalisations majeures sont activées par IRE1. L'une est dépendante de son activité d'endoribonucléase, l'autre provient d'une cascade d'activation de protéines kinases activée par IRE1 (Figure 10).

La première voie de signalisation va permettre l'épissage alternatif de l'ARNm XBP1 (X-box binding protein 1), via l'activité **endoribonucléase** d'IRE1 qui retire un intron de 26 nucléotides (Calfon et al. 2002). Le nouvel ARNm épissé, nommé XBP1-s (XBP1-spliced), code un facteur de transcription de type bZIP (basic leucine zipper) adressé au noyau (Hiderou Yoshida 2007). Dans le noyau, son domaine leucine *zipper* lui permet de se fixer sur les promoteurs des gènes contenant

une séquence ERSE (ER stress-response element) et UPRE (Unfolded protein response element) (Yamamoto et al. 2004). XBP1-s permet la transcription de gènes codant des protéines chaperons du RE (BiP), des protéines de l'ERAD, des protéines de la glycosylation et de la synthèse lipidique (P. Walter et Ron 2011). Cette voie IRE1/XBP1-s constitue la voie cytoprotectrice d'IRE1. L'activité endoribonucléasique d'IRE1 lui permet également de dégrader son propre ARNm, afin de réguler son activation (Tirasophon, Welihinda, et Kaufman 1998), mais aussi d'autres ARNm, afin de diminuer la synthèse protéique. Ce phénomène, appelé RIDD pour IRE1-dependent decay of mRNA (Hollien et al. 2009; Han et al. 2009), permet le maintien de l'homéostasie du RE. Via le système RIDD, IRE1 peut cliver les ARNm comme *PDFGR*, *SPARC* ou *Period1* (Maurel et al. 2014), mais aussi des microARN tels que *miR17* ou *miR-96* (Upton et al. 2012). Cette fonction relativement nouvelle n'entraine pas les mêmes effets (pro-survie ou pro-apoptotique) selon le type cellulaire (Upton et al. 2012; J. Hassler, Cao, et Kaufman 2012).

La forme non épissée de XBP1, XBP1-u (unspliced), est aussi traduite chez les mammifères. XBP1-u inhibe la réponse UPR en se fixant sur XBP1-s, formant un complexe dégradé par le protéasome. Cette protéine est donc un régulateur négatif de la réponse UPR (Hiderou Yoshida et al. 2006).

La seconde voie majeure en aval d'IRE1 s'active après un stress prolongé. Elle repose sur la capacité d'IRE1 à s'associer à de nombreux partenaires par l'intermédiaire de son domaine cytosolique, pour induire différentes **voies de signalisation impliquant des protéines kinases**. Suite à son association avec TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2), une protéine adaptatrice, IRE1 interagit avec ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) qui active la kinase JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Urano et al. 2000). Cette voie régule les facteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et la voie p38/MAPK (Mitogen-activated protein kinase) qui phosphoryle le facteur pro-apoptotique CHOP et entraine l'apoptose (X. Z. Wang et Ron 1996).

La voie ATF6

ATF6 est une protéine transmembranaire de type 2 du RE, de 90 kDa, possédant un domaine de type bZIP dans sa partie N-terminale cytosolique (Haze et al. 1999). Deux isoformes d'ATF6 existent, ATF6α et ATF6β, exprimés de façon ubiquitaire dans les tissus. Suite à un SRE, la dissociation de BiP démasque les 2 sites de localisation à l'appareil de Golgi d'ATF6. ATF6 migre jusqu'à l'appareil de Golgi, où il est clivé par 2 protéases, S1P et S2P (site-1 et site-2 proteases) (X.

Chen, Shen, et Prywes 2002; Shen et al. 2002; J. Ye et al. 2000). Ces protéases permettent la libération d'un fragment N-terminal de 50 kDa d'ATF6, qui rejoint le noyau pour exercer son activité de facteur de transcription en se liant aux séquences ERSE (Yamamoto et al. 2004). ATF6 permet la transcription des protéines chaperons comme BiP, la calréticuline, ou la calnexine, mais aussi d'enzymes qui catalysent la formation de ponts disulfures comme la PDI (protein disulfide isomerase). Il permet aussi la transcription du facteur XBP1, qui sera ensuite clivé par phospho-IRE1 (Adachi et al. 2008; Okada et al. 2002). Ainsi, l'activation de la voie ATF6 entraîne une réponse cytoprotective.

Interaction entre les 3 voies de l'UPR

Nous avons décrit l'UPR comme 3 branches distinctes, mais dont certaines fonctionnalités et cibles se recoupent. C'est une vision simplifiée de l'UPR car de récentes études ont montré que les protéines des 3 voies de l'UPR peuvent interagir entre elles afin d'engendrer une réponse différente de celle induite individuellement. Par exemple, XBP1-s peut interagir avec ATF6 pour former un hétérodimère capable d'activer l'expression de gènes distincts de ceux que XBP1-s ou ATF6 activent respectivement. Ces gènes vont modifier le trafic des protéines, leur repliement et leur dégradation (Shoulders et al. 2013). Des modifications post-traductionnelles peuvent survenir et régulent les fonctions des protéines comme XBP1-s qui est régulé par acétylation et sumoylation, en plus de sa phosphorylation par p38 (J. Lee et al. 2011; F.-M. Wang et Ouyang 2011; H. Chen et Qi 2010). ATF4 est aussi régulé par des phosphorylations, ubiquitinations ou acétylations qui vont affecter la stabilité de la protéine et donc sa fonction de facteur de transcription (Ameri et Harris 2008).

2. L'implication des voies de l'UPR dans le cancer

Les voies de signalisations de l'UPR participent à la régulation de l'homéostasie du RE, dans le but final d'aider la cellule à survivre face à un SRE. Cependant, ces mêmes voies peuvent également déclencher l'apoptose. L'UPR est donc une balance entre la survie et la mort. Les cellules cancéreuses peuvent tirer profit de ce mécanisme de régulation du stress, d'autant qu'elles sont confrontées à un microenvironnement souvent hostile à leur croissance. De ce fait, l'homéostasie du RE peut être dérégulée et entrainer un SRE. Dans un premier temps, nous décrirons le potentiel pro-oncogénique de l'UPR en lui-même, puis les conditions pouvant activer un SRE dans les cellules

cancéreuses, et enfin nous étudierons plus précisément la dualité de réponse au SRE de chacune des 3 voies de l'UPR.

2.1. Altération du profil d'expression des voies de l'UPR dans le cancer

Grâce aux études de séquençages à haut débit, des mutations somatiques ont été retrouvées pour les gènes codant les protéines de l'UPR dans de nombreux cancers (Figure 11) (Greenman et al. 2007). Des mutations somatiques d'IRE1 semblent être prédominantes dans les cancers du système nerveux, comparées au taux de mutation des voies ATF6 et PERK dans ces cancers. PERK est plus fréquemment muté dans les cancers des os (Figure 11 : « Other »), ainsi que dans les cancers de la sphère urinaire et du poumon. ATF6 est principalement muté dans les cancers gastro-intestinaux, génitaux et pulmonaires. Le plus fort taux de mutations des 3 voies de l'UPR est mis en évidence dans les cancers gastro-intestinaux ((Chevet, Hetz, et Samali 2015), à partir des bases de données COSMIC, cBIOportal et IntOgen).

Néanmoins, la relevance biologique de ces mutations doit encore être étudiée afin de déterminer si ces mutations sont déterminantes pour l'oncogenèse (mutations « driver ») ou non (mutations « passenger »).

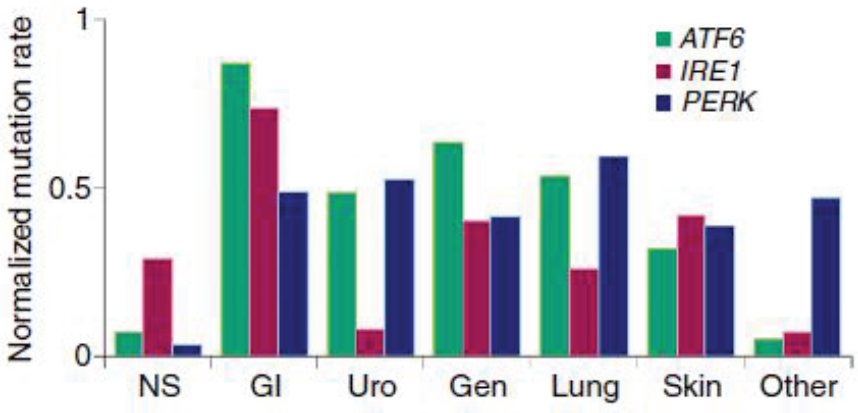


Figure 11 : Taux de mutations des protéines ATF6, IRE1 et PERK en fonction de la localisation tumorale.

Données provenant de trois bases de données COSMIC, cBIOpotal et IntOgen, rapportant le pourcentage de mutations retrouvé en fonction du nombre total de tumeurs séquencées. NS : Nervous System ; GI : gastro-intestinal, Uro : Urological, Gen : genital and gynecological. D'après (Chevet, Hetz et Samali 2015).

2.2. Les facteurs de SRE dans le cancer

Tout au long de son développement, la cellule tumorale produit et sécrète de large quantité de protéines qui vont favoriser la croissance, la prolifération et la migration cellulaire. Cette forte production induit des perturbations de l'homéostasie du RE et engendre un SRE (Dejeans et al. 2015). De plus, la cellule tumorale est soumise à de fortes perturbations de son microenvironnement (hypoxie, déplétion en nutriments, acidose…) qui sont autant de facteurs de SRE.

Dans le tissu sain, le **niveau d'oxygène** est compris entre 3,1% (pour le foie et le cerveau) et 8,7% (pour la rate) (pression partiel d'O_2 mesurée : pO_2 entre 24 à 66 mm Hg), alors qu'au sein des tumeurs, les niveaux d'oxygène peuvent varier de 0,01 à 3,9% (pO_2 entre 0,08 à 30 mmHg) (évalués dans les cancers du col de l'utérus, les adénocarcinomes, les carcinomes à cellules squameuses et le cancer du sein) (Vaupel, Kallinowski, et Okunieff 1989). La croissance non contrôlée des cellules tumorales crée une masse tumorale qui ne peut plus être irriguée par les vaisseaux adjacents, créant des zones d'hypoxie aiguë et chronique (Höckel et Vaupel 2001). Le stress hypoxique déclenche un processus permettant de développer de nouveaux vaisseaux sanguins, nommé néoangiogenèse (Folkman 2002).

Les facteurs de croissance impliqués dans la néoangiogenèse sont le bFGF (basic fibroblast growth factor), le TGFα (transforming growth factors α) et le VEGF. Le principal facteur de transcription impliqué dans ce processus est le facteur HIF-1α (hypoxia-inducible factor 1α). En condition d'oxygénation normale, HIF-1α est hydroxylé et acétylé, pour être ensuite dégradé par la voie du protéasome, après ubiquitinylation (Ke et Costa 2006). En situation d'hypoxie, HIF-1α est stabilisé et rejoint le noyau où il forme un hétérodimère avec HIF-1β. Le complexe va ainsi activer et contrôler l'expression de gènes comme le VEGF ou l'EPO (érythropoïétine), qui activent l'angiogenèse et l'érythropoïèse. HIF-1α coordonne aussi l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse (transporteurs du glucose, enzymes). Ces gènes favorisent l'entrée du glucose et son utilisation dans la glycolyse anaérobie (Huang et Bunn 2003). La surexpression de HIF-1α est rapportée dans de nombreux cancers comme l'une des réponses au stress hypoxique. Elle démontre une adaptation de la cellule à ce stress.

Cependant, l'activation de HIF-1α n'est pas suffisante pour réparer les dommages causés par l'hypoxie. Il faut en parallèle une réduction de la synthèse protéique globale, afin de réduire la consommation en énergie de la cellule. Ainsi, la cellule inhibe la voie de survie mTORC1, afin de

diminuer la traduction protéique cap-dépendante (Wouters et Koritzinsky 2008) et active la voie PERK. L'activation de PERK inhibe la traduction protéique globale via la phosphorylation d'eIF2α (Koumenis et al. 2002), renforçant l'effet de l'inhibition de mTORC1 sur la synthèse protéique. Dans les zones nécrotiques de tumeurs du sein métastatiques, donc hautement hypoxiques, les niveaux d'expression d'ATF4 sont augmentés, indiquant un rôle d'ATF4 dans la tolérance à l'hypoxie (Blais et al. 2004; Ameri et al. 2004).

L'hypoxie régule également les autres voies de l'UPR : dans les lignées de cellules tumorales de cancer du sein et d'hépatocarcinome, l'hypoxie entraine une surexpression de XBP1-s (Romero-Ramirez et al. 2004). Dans le cancer du sein triple négatif, l'expression génique de XBP1 est fortement corrélée à l'expression de HIF-1α. XBP1 forme un complexe transcriptionnel avec HIF-1α et augmente l'expression des gènes cibles de HIF-1α (X. Chen et al. 2014). De même, en condition d'hypoxie, ATF6 active l'expression des gènes associés à la transformation des carcinomes hépatocellulaires (Arai et al. 2006).

En s'adaptant aux conditions d'hypoxie, les cellules tumorales deviennent plus résistantes aux thérapies. Les vaisseaux formés au cours de la néoangiogenèse sont en effet anarchiques et la diffusion des molécules jusqu'au centre de la tumeur se fera moins facilement (Teicher 1995). Les cellules en situation d'hypoxie sont aussi plus résistantes à la radiothérapie, car ce traitement repose sur un processus oxydatif dépendant de l'oxygène créant des dommages au niveau de l'ADN. Les patients dont les tumeurs de la tête et du cou présentent des zones d'hypoxie possèdent une moins bonne survie comparés aux patients dont les tumeurs sont mieux oxygénées (Brizel et al. 1997) et ces tumeurs sont plus résistantes aux radiations (Gatenby et al. 1988).

Un autre facteur environnemental pouvant entraîné un SRE dans les cellules cancéreuses est la **déplétion en nutriments** (glucose et acides aminés). Le senseur principal de la privation en glucose est PERK, et de la privation en acides aminés est GCN2 (Ronald C. Wek et Cavener 2007; P. Zhang et al. 2002). Les deux protéines, une fois activées, vont phosphoryler eIF2α. Il en résulte l'atténuation de la synthèse protéique globale et la traduction de certains ARNm comme ATF4, qui entraine la transcription de gènes impliqués dans le transport et la synthèse d'acides aminés et de glucose (R. C. Wek et al. 1990; S. A. Wek, Zhu, et Wek 1995), ou de gènes de l'angiogenèse comme le VEGF (Y. Wang et al. 2012; Y. Wang et al. 2013).

2.3. Dualité de la réponse UPR dans l'oncogenèse

Nous venons de voir que l'UPR participe à la régulation de l'homéostasie du RE, on l'appelle alors UPR adaptative, mais que les voies de l'UPR sont aussi capables de déclencher l'apoptose. Nous allons à présent discuter de cette dualité dans l'oncogenèse et le développement tumoral.

2.3.1. Dualité de la voie PERK

Le rôle de PERK dans la progression tumorale a d'abord été attribué à son effet protecteur en réponse à l'hypoxie. En effet, son inactivation rend les cellules plus sensibles à l'hypoxie *in vitro*, et réduit la croissance des tumeurs *in vivo* (Fels et Koumenis 2006). Dans un modèle de greffes sous-cutanées, les cellules MEF $PERK^{-/-}$ transformées par Ras forment des tumeurs plus petites et déclenchent plus d'apoptose dans les zones hypoxiques que les MEF $PERK^{+/+}$ transformées (Bi et al. 2005).

Dans un modèle murin de carcinome mammaire, il a été démontré que la délétion de PERK diminue le développement de tumeurs mammaires et l'incidence des métastases pulmonaires de 50% (Bobrovnikova-Marjon et al. 2010). Paradoxalement, cette étude démontre également que l'inactivation de PERK à long terme peut augmenter la susceptibilité de développer des tumeurs mammaires spontanées, due à l'augmentation de l'instabilité génomique. La dualité de la voie PERK repose ici sur la durée d'inhibition de la voie. Une inhibition à court terme, aiguë, montre que PERK possède un rôle pro-tumoral, alors qu'une inhibition longue et chronique de cette voie révèle des effets anti-tumoraux.

L'activation de PERK dans les cellules tumorales peut aussi promouvoir la tumorigenèse en favorisant l'angiogenèse. En effet, Gupta *et al.* ont démontré une diminution de la formation et de la croissance des insulinomes dans un modèle murin inactivé pour PERK, associé à une forte réduction de la vascularisation tumorale (Gupta, McGrath, et Cavener 2009).

Des études ont démontré que l'activation de la voie PERK dans un modèle cellulaire inductible Fv2E-PERK entrainait au contraire l'arrêt de la croissance cellulaire et la suppression de la croissance tumorale *in vivo*, dans le cas du cancer épidermoïde cutané (Ranganathan et al. 2008). Ce phénomène dépendrait d'eIF2α dont l'activation induit l'arrêt de la traduction protéique, dont des régulateurs du cycle cellulaire comme la cycline D1. Il s'en suit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Sequeira et al. 2007; Perkins et Barber 2004).

Des études ont attribué un rôle suppresseur de tumeur à CHOP. Dans un modèle murin de tumeurs pulmonaires induites par la mutation *Kras*^{G12V}, la délétion de CHOP a augmenté l'incidence des tumeurs (Huber et al. 2013). Ces travaux montrent aussi que l'activation de l'UPR contrôle la croissance des cellules malignes pendant une privation en glucose. En atténuant la voie PERK/eIF2α/CHOP via l'expression de p58^{IPK}, les cellules tumorales s'adaptent au SRE et se développent. De même, la délétion de CHOP dans les hépatocytes favorise la tumorigenèse dans un modèle murin d'hépatocarcinome (Nakagawa et al. 2014). CHOP jouerait donc un rôle dans la barrière anti-tumorale de la réponse UPR. Il a été rapporté des mutations de CHOP dans les tumeurs humaines, mais on ne sait pas encore si ces mutations affectent l'expression protéique et la fonctionnalité de CHOP et si elles contribuent à la tumorigenèse (Kan et al. 2010).

Selon le modèle tumoral, la voie PERK pourra donc aussi bien servir que nuire à la croissance des cellules cancéreuses.

2.3.2. Dualité de la voie IRE1

Dans la littérature, le rôle de la voie IRE1/XBP1s est plutôt protecteur et en faveur de la survie tumorale. Ce rôle a été largement étudié dans le myélome multiple, car la différenciation de lymphocytes B en plasmocytes nécessite XBP1-s (Reimold et al. 2001; Iwakoshi et al. 2003; K. Zhang et al. 2005). Grâce à un modèle de souris transgéniques exprimant XBP1-s tout au long du développement des lymphocytes B, Carrasco *et al*. ont démontré que le maintien d'une forte expression de XBP1-s conduit à un phénotype de myélome multiple, avec des lésions osseuses et une accumulation d'immunoglobulines (Carrasco et al. 2007). De plus, des mutations d'IRE1α et de XBP1 ont été identifiées dans les cellules tumorales de patients atteints de myélome multiple (Hong et Hagen 2013; Leung-Hagesteijn et al. 2013).

Dans un modèle d'induction chimique et génétique murin de cancer colorectal, la délétion d'XBP1 dans les cellules épithéliales intestinales favorise leur prolifération (Niederreiter et al. 2013). L'avantage pro-tumoral que confère XBP1 peut s'expliquer par la régulation du cycle cellulaire par XBP1. En effet, IRE1 augmente la prolifération cellulaire via la régulation de la cycline A1 par XBP1-s dans une lignée cellulaire de cancer de la prostate (Thorpe et Schwarze 2010).

Tout comme PERK, IRE1 participerait également à l'angiogenèse. Dans un modèle murin de xénogreffe de cellules de gliome U87, les tumeurs n'exprimant pas IRE1 possèdent un phénotype

peu vascularisé comparé aux tumeurs exprimant IRE1. La voie IRE1 régule positivement les facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF-A, l'IL-1 (interleukine-1), l'IL-6 et l'IL-8 (Auf et al. 2010).

La voie IRE-1 peut enfin être pro-apoptotique. En effet, l'activation de la voie IRE1 est capable d'induire l'apoptose via le recrutement de TRAF2 à la membrane du RE, ce qui active ensuite JNK. Il s'en suit une apoptose via l'activation de la caspase-12 (Yoneda et al. 2001). IRE1 peut aussi médié l'apoptose via le système RIDD, autre voie induite par l'activation d'IRE1. Une activation prolongée du SRE induit RIDD qui dégrade des pré-miARN et des ARN de protéines impliquées dans la survie (Han et al. 2009; Maurel et al. 2014). RIDD peut aussi avoir un rôle pro-tumoral. Dans le cas du glioblastome, l'activation de RIDD par IRE1 diminue la quantité de l'ARNm de PER1, protéine du cycle circadien. Cette dégradation de l'ARNm de PER1 favorise la tumorigenèse et la survie. Cela peut s'expliquer par une meilleure vascularisation et un taux de prolifération plus élevé, car les tumeurs issues de cellules déficientes pour PER1 sont plus vascularisées et ont un coefficient de prolifération Ki-67 supérieur au contrôle (Pluquet et al. 2013). Cette étude confirme le rôle pro-angiogénique d'IRE1 montré précédemment.

2.3.3. Dualité de la voie ATF6

Au contraire de PERK et d'IRE1, ATF6 engendre une réponse principalement cytoprotective (cf. § La voie ATF6), et les études menées sur la relation entre ATF6 et l'oncogenèse montrent un rôle pro-tumoral.

La translocation nucléaire d'ATF6 a été observée dans différent types de cancers comme l'hépatocarcinome (Shuda et al. 2003). Dans des cellules d'hépatocarcinome, il promeut le développement tumoral, via la régulation de gènes du cycle cellulaire et de la prolifération (Arai et al. 2006).

ATF6 joue aussi un rôle dans l'adaptation des cellules tumorales à différents stress. Par exemple, la suractivation d'ATF6 confère une résistance au traitement par imatinib dans la leucémie myéloïde chronique (Higa et al. 2014). C'est aussi un facteur de survie pour les cellules tumorales quiescentes de cancer épidermoïde cutané et il contribue à l'adaptation à la déplétion en glucose et à la résistance à la rapamycine. Le mécanisme pro-survie d'ATF6 dépend de la régulation de Rheb et l'activation de la voie de survie mTOR, indépendamment d'Akt (Schewe et Aguirre-Ghiso 2008).

BiP, la protéine chaperon majoritaire du RE, est principalement régulée par ATF6. Une augmentation de son expression a été observée dans une grande variété de cancers comme les cancers du sein, du foie, de la prostate, du colon, de l'intestin ou dans le glioblastome (Z. Li et Li 2012).

La première corrélation entre BiP et la tumorigenèse a été rapporté en 1996 par le groupe de Dr. Lee, qui a démontré que la suppression de BiP diminue la capacité de cellules issues de fibrosarcomes à former des tumeurs sous-cutanées chez les souris BALB/c (Jamora, Dennert, et Lee 1996). Il a ensuite été démontré que la surexpression de BiP corrèle avec une augmentation de la prolifération des cellules de gliomes, et que la diminution de l'expression de BiP grâce à un siARN a pour conséquence un ralentissement de la prolifération (Pyrko et al. 2007).

BiP contrôle les stades précoces de développement tumoral via l'induction de la quiescence (Denoyelle et al. 2006), mais également les stades plus tardifs en favorisant la progression tumorale et métastatique lorsque la tumeur est exposée à de plus importants stress environnementaux (Dong et al. 2011; Dong et al. 2008).

BiP joue aussi un rôle important dans l'angiogenèse tumorale. La délétion hétérozygote de BiP dans les cellules endothéliales d'un modèle de tumeur mammaire a induit une réduction de l'angiogenèse et de la croissance métastatique, sans impacter le réseau vasculaire du tissu normal adjacent (Dong et al. 2011).

Normalement localisé dans la lumière du RE, BiP est exprimé à la membrane cellulaire après un SRE (Arap et al. 2004). Ce phénomène a été observé dans les cellules endothéliales et néoplasiques (Z. Li et Li 2012). La localisation en surface de BiP affecte la prolifération, l'apoptose et l'immunogénicité anti-tumorale (Luo et Lee 2013). Des protéines se liant à BiP à la surface cellulaire ont été identifiées. Dans les cellules de cancer de la prostate par exemple, BiP se lit à l'inhibiteur de protéinase α_2-macroglobuline, ce qui augmente la prolifération cellulaire via l'activation de p38 et PI3K (Misra et Pizzo 2012). BiP peut également interagir avec la protéine de surface cellulaire tumorale Cripto pour réguler la progression tumorale (Shani et al. 2008). Enfin, par sa liaison avec T-cadherine, BiP permet l'accélération de l'angiogenèse en condition de SRE (Nakamura et al. 2013).

3. L'UPR dans les NNE GEP

Les NNE GEP dérivent de cellules neuroendocrines hautement sécrétrices, mobilisant fortement les fonctions du RE, et pouvant activer une réponse UPR. Les études concernant l'UPR au sein des NNE GEP ont principalement été conduites dans les cellules dérivées de TNE pancréatiques, notamment les cellules INS-1.

Un clone INS-1 exprimant une pro-insuline mutée inductible a permis l'analyse de la réponse UPR des cellules INS-1 suite à un SRE (Hartley et al. 2010). Les cellules activent les 3 voies de l'UPR et induisent les gènes pro-apoptotiques dont *Chop* après 48 heures d'expression de la pro-insuline mutée.

Gupta *et al.* ont évalué le rôle de PERK dans la régulation de la prolifération et de l'angiogenèse dans les insulinomes (Gupta, McGrath, et Cavener 2009). Grâce à un modèle murin d'insulinome, il a pu démontrer que PERK jouait deux rôles dans le développement des insulinomes : PERK soutient la prolifération rapide lors de la création d'une hyperplasie des îlots de cellules β-pancréatiques, puis il promeut l'angiogenèse dans les stades plus tardifs de progression, au moment où les tumeurs deviennent encapsulées. Dans les insulinomes de souris dont le gène de PERK est inactivé, les tumeurs étaient en moyenne 38 fois plus petites que celles des souris contrôles, et la vascularisation tumorale était réduite de manière très importante. Cette étude ne relate que l'utilité de PERK dans la progression tumorale d'insulinome, et ne fait pas état de l'utilité des voies IRE1 et ATF6.

Le rôle d'ATF6α dans la survie de cellules d'insulinomes a été étudié *in vitro*, où il est détecté dans les cellules d'insulinomes INS-1 et INS-1E, et *in vivo*, au niveau des îlots β-pancréatiques de rongeurs. Son niveau d'expression est augmenté suite à un SRE induit pharmacologiquement ou suite à une forte concentration de glucose, mimant une hyperglycémie. Une diminution de 60% de l'expression d'ATF6α suite à la transfection d'un siARN dirigé contre ATF6α a entrainé une réduction de l'expression de BiP dans les cellules à l'état basal, ainsi qu'un phénotype apoptotique, mais n'a pas induit les 2 autres voies de l'UPR. Ainsi, ATF6α possède un rôle dans le maintien de la survie des cellules d'insulinomes à l'état basal (Teodoro et al. 2012).

ATF6β est moins étudié qu'ATF6α. Ces 2 isoformes sont exprimés de manière ubiquitaire dans les cellules de mammifères, et ils s'activent suite à un SRE (Haze et al. 1999). L'ARNm et la protéine d'ATF6β ont été détectés dans les lignées cellulaire β-pancréatiques, ainsi que dans les îlots pancréatiques murins et humains. La délétion d'ATF6β dans les cellules INS-1 d'insulinome

augmente la sensibilité à l'apoptose suite à un traitement avec des inducteurs du SRE comme la thapsigargine ou la tunicamycine. Une augmentation de l'apoptose suite à la délétion du gène d'ATF6β dans les conditions basales, sans stress induit, suggère qu'ATF6β est nécessaire à la survie des cellules (Odisho, Zhang, et Volchuk 2015).

La balance entre la survie et la mort induite par l'UPR a aussi été étudiée dans les cellules murines d'insulinome MIN-6 (J. Y. Chan et al. 2015). La voie IRE1/XBP1 est nécessaire à l'adaptation des cellules au SRE induit par les cytokines et les acides gras saturés, et une balance optimale entre XBP1 et le facteur pro-apoptotique CHOP est cruciale pour la survie des cellules MIN6. L'importance de la voie XBP1 a été confirmée dans les cellules β-pancréatiques primaires de souris, notamment pour sa capacité à induire des gènes impliqués dans l'augmentation des capacités du RE lors d'une surproduction d'insuline, et pour la protection contre le stress oxydatif (J. R. Hassler et al. 2015).

Enfin, une étude a analysé une série de TNE pancréatiques humaines afin de déterminer l'étendue du SRE et de l'apoptose médiée par l'UPR dans ces tumeurs (Klieser et al. 2015). Les données issues du transcriptome de 49 TNE pancréatiques ont permis de montrer que l'expression des ARNm de BiP, ATF4 et CHOP est augmentée de manière significative dans le tissu pancréatique tumoral, comparé au tissus pancréatique sain. L'expression de la caspase 4, qui s'active spécifiquement en présence d'inducteurs du SRE a également été évaluée (Hitomi et al. 2004). Son expression augmente significativement dans le tissu pancréatique tumoral.

4. L'UPR comme facteur pronostique dans le cancer

De récentes études ont évalué l'implication clinique des marqueurs d'activation de l'UPR sur le pronostic de différentes tumeurs solides. Les différents travaux publiés sont résumés dans le tableau 5.

Par exemple, chez les patientes atteintes de cancer du sein triple négatif, une augmentation de l'épissage de l'ARN de XBP1 est de mauvais pronostic. L'augmentation de l'expression de XBP1-s accroit le développement et la progression tumorale via la régulation de HIF1α et de ses gènes cibles (X. Chen et al. 2014).

Tableau 5 : Etudes cliniques évaluant les marqueurs de l'UPR comme facteur pronostique de survie dans différents types de cancer.

Type tumoral (références)	Expression des marqueurs de l'UPR	Pronostic
Cancer du sein positif aux récepteurs à l'œstrogène (Andruska et al. 2015)	Augmentation de l'UPR (signature génétique)	Diminution de la survie globale
Cancers du sein (différents types) (Davies et al. 2008)	Augmentation de l'expression de XBP1-s	Diminution de la survie sans progression
Cancer du sein triple négatif (X. Chen et al. 2014)	Augmentation de l'expression de XBP1-s	Diminution de la survie sans progression
Cancer du poumon non à petites cellules (K. M. Kim et al. 2012; He et al. 2011)	Augmentation de l'expression de CHOP	Diminution de la survie globale
	Augmentation de l'expression de BiP	Augmentation de la survie globale
	Augmentation de l'expression de P-eIF2α	Augmentation de la survie globale
Mésothéliome (Dalton et al. 2013)	Augmentation de l'expression de CHOP	Diminution de la survie globale
Carcinome du rein (Kuroda et al. 2011)	Augmentation de l'expression de BiP	Diminution de la survie sans progression
Adénocarcinome de la prostate (Tan et al. 2011; Pootrakul et al. 2006)	Augmentation de l'expression de BiP	Diminution de la survie globale
Adénocarcinome colorectal (Thornton et al. 2013; Jin et al. 2016)	Augmentation de l'expression de BiP	Augmentation de la survie globale
	Expression d'IRE1α	Diminution de la survie globale
Glioblastome (Pluquet et al. 2013)	Augmentation de l'expression de XBP1-s	Diminution de la survie globale
Adénocarcinome ductal pancréatique (Niu et al. 2015)	Augmentation de l'expression de XBP1-s	Diminution de la survie globale

Une forte expression de XBP1 au moment du diagnostic est aussi de mauvais pronostic dans la leucémie lymphoblastique aiguë pré-B (Kharabi Masouleh et al. 2014), et il a été démontré que l'inhibition pharmacologique d'IRE1 tue efficacement les cellules lymphoblastiques pré-B (Tang et al. 2014).

L'évaluation de l'UPR comme facteur pronostic a été étudiée sur une série de 49 TNE pancréatiques humaines (Klieser et al. 2015). Les données issues du transcriptome des TNE pancréatiques ont permis de montrer que l'expression des ARNm de BiP est corrélée à l'invasivité de la tumeur, ainsi qu'à l'atteinte des ganglions lymphatiques, la présence de métastases, un grade plus élevé (G3 versus G1) et aux tumeurs non fonctionnelles. L'expression d'ATF4 est inversement corrélée à l'invasivité, au grade et à la présence de métastases. Son expression sera plus forte si les ganglions lymphatiques sont touchés et si la tumeur est fonctionnelle. Plus la tumeur est invasive, moins CHOP est exprimé. Ainsi, dans cette étude, BiP serait un facteur de mauvais pronostic alors qu'ATF4 et CHOP seraient des facteurs de bon pronostic.

Les résultats de ces études restent controversés, probablement dû à l'utilisation d'un seul marqueur de l'UPR et d'une seule technique de détection (immunohistochimie le plus souvent). L'utilisation d'une signature génétique de chacune des voies ou d'un facteur de transcription particulier permettra d'être plus spécifique et précis.

L'activation des voies de l'UPR pourra aussi être utilisée comme marqueur de réponse au traitement. En effet, Andruska *et al.* a démontré que la surexpression des gènes cibles de l'UPR pouvait prédire d'une résistance au traitement tamoxifène chez les patients atteints de cancer du sein positif aux récepteurs à l'œstrogène (Andruska et al. 2015). Dans le cas de patients atteints de myélome multiple et traité par le bortézomib, une surexpression de XBP1-s est de meilleur pronostic (Gambella et al. 2014). Enfin, la surexpression de BiP est corrélée à la chimiorésistance au bortezomib des cellules endothéliales ou de myélome OPM-2, ce qui peut en faire un bon marqueur prédictif de réponse au traitement (Kern et al. 2009).

Une étude récente a montré que l'α-foeto-protéine (AFP) est fortement régulée par IRE1 (via RIDD) et PERK dans les cellules d'hépatocarcinome exposées au sorafenib, inhibiteur de tyrosine-kinase. L'AFP est un facteur prédictif de réponse au traitement par sorafenib : une diminution du taux d'AFP sérique est synonyme de contrôle de la maladie. Le sorafenib active les voies IRE1 et PERK. L'inhibition des 2 voies a permis de restaurer le niveau d'ARNm de l'AFP. Ainsi, l'activation des voies IRE1 et PERK par le traitement permet une meilleure réponse et régule l'AFP, un marqueur

prédictif de réponse au traitement dans les carcinomes hépatocellulaires (Houessinon et al. 2016). C'est la première fois qu'est mis en évidence un marqueur tumoral régulé par l'UPR.

L'UPR constitue donc un facteur important dans l'oncogenèse, mais une meilleure compréhension de son implication dans les différents types de cancer est nécessaire pour permettre de l'utiliser un jour comme biomarqueur pronostique de survie, voire comme marqueur prédictif de réponse aux traitements.

5. L'UPR comme cible thérapeutique anti-cancéreuse

L'UPR joue donc un rôle complexe dans le développement tumoral, mais il émerge néanmoins comme une cible thérapeutique, selon 2 grandes stratégies. La première vise à inhiber les voies de l'UPR soit par des inhibiteurs directs des protéines « senseurs » PERK, IRE1 ou ATF6, soit par le ciblage de leurs effecteurs. La seconde stratégie vise à perturber l'équilibre homéostatique du RE des cellules tumorales pour accentuer et prolonger le SRE, afin que les capacités du RE soient dépassées et que l'UPR conduise à l'apoptose. Différentes molécules ont été développées pour cibler l'UPR, dont celles présentées dans le tableau 6.

Stratégie 1 : Inhibition des voies de l'UPR

Parmi les molécules qui inhibent spécifiquement les voies de l'UPR et permettent ainsi d'augmenter l'intensité globale du SRE, on trouve la molécule **GSK2656157**, un inhibiteur de la phosphorylation de PERK (Atkins et al. 2013). Elle possède une activité antiprolifération sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, et un effet anti-tumoral *in vivo* démontré dans 3 modèles murins de tumeurs du pancréas et un modèle de myélome multiple. La molécule diminue le volume tumoral de 54 à 114% dans ces modèles. Ces effets corrèlent avec une densité vasculaire moindre et une perfusion de la tumeur plus faible. Son effet n'a pas encore était testé dans une étude clinique, sans doute car les études précliniques ont fait état d'importants effets indésirables sur les cellules pancréatiques exocrines et endocrines (dégénération et atrophie des acini pancréatiques, dégénération des îlots de Langerhans, réversibles après deux semaines d'arrêt du traitement) (Atkins et al. 2013).

Le **salubrinal** est un inhibiteur du complexe PP1/GADD34 qui déphosphoryle eIF2α (Boyce et al. 2005). Il permet de maintenir l'arrêt de la traduction protéique entrainé par la phosphorylation d'eIF2α. *In vitro*, elle a démontré son efficacité en combinaison avec le bortezomib sur des cellules quiescentes de myélome multiple (Schewe et Aguirre-Ghiso 2009). Une étude de phase II explore actuellement son rôle dans le traitement du myélome multiple, en combinaison avec le carfilzomib, inhibiteur du protéasome (NCT01775553).

Un inhibiteur de l'activité endoribonucléasique d'IRE1, **B-109**, supprime la progression de la leucémie lymphoïde chronique dans un modèle murin (Tang et al. 2014). **STF-083010**, une autre molécule inhibitrice de l'activité RNase d'IRE1, est en stade préclinique dans le myélome multiple où elle inhibe la croissance de xénogreffes (Papandreou et al. 2011). La molécule **MKC-3946** inhibe l'épissage de XBP1 et permet de réduire significativement la croissance de xénogreffes sous-cutanées dans un modèle murin de myélome multiple RPMI 8226 (Mimura et al. 2012).

Nous avons vu que BiP peut être exprimé à la surface des cellules cancéreuses, au contraire des cellules normales, ce qui en fait une cible idéale pour un traitement antitumoral (Arap et al. 2004). Des inhibiteurs de BiP, qui suppriment son expression comme le **DHA**, ou sous forme d'anticorps se liant à BiP à la surface des cellules cancéreuses (**PAT-SM6**) sont respectivement en cours de phase II/III dans les tumeurs solides et en cours de phase I dans le myélome multiple (M. Wang et Kaufman 2014).

L'**arctigénine**, principe actif de la plante *Arctium lappa*, permet d'inhiber la réponse UPR lors d'une déplétion en glucose, en bloquant l'expression de P-PERK, ATF4, CHOP et BiP dans les cellules HT-29 de cancer du côlon. Cette molécule a démontré une activité anti-tumorale dans les xénogreffes de cancer du côlon, en supprimant la croissance tumorale (J.-Y. Kim et al. 2010). Une étude de phase I a été conduite chez des patients présentant un cancer du pancréas avancé et réfractaire à la gemcitabine (UMIN000005787), utilisant la forme orale de l'arctigénine, le GBS-01, un extrait du fruit d'*Arctium lappa*, traditionnellement utilisée dans la pharmacopée japonaise (Ikeda et al. 2016). Une étude de phase II (UMIN000010111) est en cours, afin d'évaluer l'efficacité et la sécurité chez les patients atteints de tumeurs pancréatiques réfractaires à la gemcitabine.

Stratégie 2 : perturbation de l'équilibre homéostatique du RE

Le **bortezomib** est un inhibiteur du protéasome. Il engendre un arrêt de la dégradation des protéines par le protéasome, ce qui provoque une accumulation de protéines ubiquitinylées dans la lumière du RE. Le SRE ainsi provoqué par l'accumulation de protéines entraine l'apoptose des cellules tumorales. C'est la première molécule inhibitrice du protéasome qui a été approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) dans le traitement du myélome multiple et du lymphome à cellules du manteau (Schewe et Aguirre-Ghiso 2009; Ri 2016). Il a été récemment montré que la délétion d'IRE1 ou XBP1 entrainait des résistances aux inhibiteurs du protéasome, dues à la sélection de cellules qui ne synthétisent pas de fort taux d'immunoglobulines, les pré-plasmoblastes (Leung-Hagesteijn et al. 2013). Cela montre que des cellules hautement sécrétrices répondront plus efficacement aux inhibiteurs du protéasome. Une étude a évalué l'effet biologique du bortezomib sur des lignées de TNE humaines pancréatiques BON-1 et pulmonaires NCI-H727 (Larsson et al. 2010). Ils démontrent que le bortezomib possède une activité cytotoxique *in vitro* avec une augmentation significative de l'activité caspase-3 après 48 heures de traitement. Une étude clinique de phase II a évalué l'effet du bortézomib sur 16 patients porteurs d'une TNE pancréatique ou gastro-intestinale métastatique, mais n'a donné aucune réponse objective (Shah et al. 2004).

La molécule **4-PBA** (acide 4-phenobutyrique ou phénylbutyrate de sodium) est un inhibiteur de l'histone désacétylase dont l'utilisation est approuvée dans le traitement des désordres du cycle de l'urée. Il permet la stimulation d'une voie alternative d'élimination de l'azote. Elle agit aussi en tant que protéine chaperon. Elle permet d'éviter l'agrégation des protéines non repliées et de diminuer le SRE (Cortez et Sim 2014). Dans un modèle murin de diabète de type 2, cette molécule permet de réduire l'activation de l'UPR (diminution de la phosphorylation de PERK et eIF2α et de l'activation de JNK) et d'augmenter les capacités d'adaptation du RE (U. Ozcan et al. 2006). Elle inhibe la croissance de cellules humaines de cancer de l'estomac par arrêt du cycle cellulaire (L.-Z. Li et al. 2012). De plus, l'inhibition du SRE par le 4-PBA augmente l'apoptose causée par le cisplatine dans les cellules humaines de cancer du poumon H460. Le 4-PBA diminue le SRE provoqué par le cisplatine (Shi et al. 2016). L'efficacité du 4-PBA est actuellement évaluée en combinaison avec le 5-FU dans le cancer colorectal avancé (NCT00002796).

Tableau 6 : Molécules ciblant l'UPR et phases de développement clinique.

Mécanisme d'action	Molécule	Développement pharmaceutique
Inhibiteur de la phosphorylation de PERK	GSK2656157	Stade préclinique (tumeur du pancréas et myélome multiple)
Inhibiteur du complexe PP1/GADD34	Salubrinal	Phase II (myélome multiple)
Inhibiteur de l'activité endoribonucléase d'IRE1	B-109	Stade préclinique (leucémie lymphoïde chronique)
	STF-083010	Stade préclinique (myélome multiple)
	MKC-3946	Stade préclinique (myélome multiple)
Inhibiteur de BiP	DHA	Phase II/III (tumeurs solides)
	PAT-SM6	Phase I (myélome multiple)
	Arctigénine (GSB-01)	Phase I (tumeur du pancréas)
Inhibiteur du protéasome	Bortezomib	AMM myélome multiple et lymphome à cellules du manteau
Protéine chaperon	4-PBA	Phase I/II (cancer colorectal)

Les molécules ciblant l'UPR peuvent aussi être utilisées en association avec d'autres traitements anti-cancéreux, afin, par exemple, de prévenir l'activation de l'UPR pour sensibiliser les cellules cancéreuses aux autres thérapies.

Dans des cellules de glioblastome humain résistant aux thérapies utilisant des virus oncolytiques (Maraba virus), l'ajout d'un inhibiteur d'IRE1 accroit la sensibilité de ces cellules aux thérapies oncolytiques, *in vitro* et *in vivo* (Mahoney et al. 2011). Dans des cellules de myélome multiple, le MKC-3946, un inhibiteur d'IRE1, potentialise l'apoptose induite par le bortezomib. Cette combinaison déclenche une apoptose dépendante de la voie PERK/CHOP/caspase-3 et une inhibition de la croissance tumorale (Mimura et al. 2012).

Les cellules hypoxiques sont beaucoup plus résistantes à la radiothérapie, car elles nécessitent presque 3 fois plus de temps de radiation que les cellules normoxiques pour mourir. Rouschop *et al*. ont démontré que l'activation de la voie PERK/eIF2α contribue à la survie des cellules U373-MG de glioblastomes hypoxiques radiorésistantes, grâce à l'induction de la synthèse de glutathion et la protection contre les espèces réactives de l'oxygène (Rouschop et al. 2013). L'inhibition de la voie PERK/eIF2α permettrait de rendre les cellules radiorésistantes plus sensibles à l'irradiation.

Ces traitements vont donc cibler les cellules qui subissent un SRE et qui ont besoin d'une réponse UPR pour survivre. Nous avons vu que certaines cellules activent le SRE de manière physiologique, notamment les cellules hautement sécrétrices comme les cellules endocrines du pancréas. On peut donc supposer que ces molécules provoqueront des effets collatéraux dans ce type de cellules. Un nouveau composé nommé ISRIB bloque les effets de la phosphorylation d'eIF2α : il diminue l'expression d'ATF4 et restaure partiellement la synthèse protéique (Sidrauski et al. 2015). Contrairement à l'inhibiteur de PERK GSK2656157, ISRIB n'est pas toxique pour le pancréas (Halliday et al. 2015). L'inhibition plus faible de la voie eIF2α/ATF4 par ISRIB comparé à celle de GSK2656157 peut expliquer l'absence de toxicité. Le traitement de cellules cancéreuses pancréatiques PANC-1 avec le composé ISRIB augmente l'apoptose médiée par la gemcitabine, connue pour activer la voie PERK/eIF2α/ATF4 dans ces cellules. Il permet également de diminuer la taille tumorale, en combinaison avec la gemcitabine, dans un modèle murin orthotopique utilisant les cellules PANC-1 (Palam et al. 2015).

6. La relation entre l'UPR et la voie mTOR

La voie mTOR est activée dans les NNE GEP et nous avons vu l'intérêt de cibler cette voie pour le traitement des NNE GEP. Nous savons également que l'UPR est activé dans les TNE pancréatiques notamment. Ces deux voies de régulation cellulaire partagent des fonctions communes, comme la régulation de la synthèse protéique. Nous allons discuter ici de la relation qui existe entre les complexes mTORC1 et mTORC2 et l'UPR.

6.1. mTORC1 et UPR

La voie mTORC1 et l'UPR permettent d'augmenter la synthèse lipidique, l'angiogenèse et la résistance à l'insuline. Par contre, ils ont des effets opposés sur l'autophagie, inhibée par mTORC1, favorisée par l'UPR, la traduction protéique et la biogenèse des ribosomes, favorisées par mTORC1, inhibées par l'UPR, et enfin l'apoptose, inhibée par mTORC1 et favorisée dans certains cas par l'UPR (Appenzeller-Herzog et Hall 2012). Les études de l'interaction entre la voie mTOR et l'UPR montrent que l'activation de l'UPR peut survenir aussi bien en aval qu'en amont de mTORC1.

Une activation constitutive de mTORC1 par la perte du complexe TSC1/2 (inhibiteur de mTORC1) dans les lignées cellulaires MEF et dans les tumeurs de souris ou humaines entraine un

SRE et l'activation de l'UPR (U. Ozcan et al. 2008). Cette activation pourrait être la conséquence d'un mécanisme de protection de la cellule contre la synthèse protéique trop importante engendrée par l'activation constitutive de mTORC1. Parmi les voies de l'UPR pouvant être induite par mTORC1, la mieux documentée est IRE1/ASK1/JNK. Ozcan *et al.* ont démontré que la stimulation de la voie IRE1/ASK1/JNK par mTORC1 contribue à l'apoptose médiée par le SRE dans les cellules déficientes pour TSC1/2. De plus, cette voie contribue au rétrocontrôle négatif de mTORC1 sur IRS1 et elle participe au développement de la résistance à l'insuline. En effet, il montre que la diminution du niveau de SRE grâce au 4-PBA prévient la dégradation d'IRS1 et permet de retrouver en partie l'action de l'insuline (U. Ozcan et al. 2008). Dans les cellules d'insulinome INS-1E, il a aussi été démontré que la voie mTORC1 régulait la voie IRE1/ASK1/JNK dans des conditions de glucotoxicité et lipotoxicité, favorisant l'apoptose (Bachar et al. 2009). Dans ces deux études, l'ajout de rapamycine, inhibiteur de mTOR, permet de diminuer la synthèse protéique médiée par mTORC1, mais aussi de diminuer le niveau de SRE, la réponse UPR et l'apoptose. Les cellules dont l'activité de mTORC1 est augmentée, et donc le SRE, ont une plus grande sensibilité aux agents induisant un SRE (U. Ozcan et al. 2008). Cibler le SRE dans ces conditions où mTORC1 est dérégulée peut donc potentiellement être délétère pour les cellules tumorales.

Nous avons vu que des interactions entre Rheb et mTORC1 sont nécessaires pour promouvoir la synthèse de protéines. L'étude de Tyagi *et al.* en 2015 a montré que Rheb peut aussi interagir avec la voie PERK/eIF2α afin de l'activer et inhiber la synthèse protéique (Tyagi et al. 2015). Dans cette étude menée sur les cellules HEK293 et MEF, sous condition de SRE induit par la tunicamycine, mTOR est inhibé et perd son interaction avec Rheb. Ce dernier se lie alors à PERK afin de l'activer. Rheb possède plusieurs séquences de phosphorylation, ce qui pourrait expliquer sa capacité à soit stimuler la synthèse protéique (via mTORC1) soit l'inhiber (via PERK). On sait par exemple que la phosphorylation de Rheb sur la sérine 130 par la kinase PRAK (p38-regulated/activated kinase) inhibe l'activation de mTOR (Zheng et al. 2011).

D'autres études montrent que le SRE peut activer la voie PI3K/Akt/mTORC1 (Di Nardo et al. 2009; Y. Li et al. 2011). L'étude de Kato *et al*. montre que le SRE induit rapidement l'activation de mTORC1, qui va réduire l'activation d'Akt via la boucle de rétrocontrôle négatif dans les cellules épithéliales tubulaires rénales de rat. La diminution de l'activité d'Akt est responsable de l'activation de la voie IRE1-JNK et de l'apoptose qui s'en suit, sans affecter les autres voies de l'UPR. L'ajout de rapamycine inhibe mTORC1 et attenue l'apoptose médiée par le SRE en supprimant sélectivement

la voie IRE1/JNK (Kato et al. 2012). Cela suggère que l'activation de la voie IRE1/JNK par l'activation constitutive de mTORC1 induit la mort cellulaire (Kang, Lu, et Guan 2011).

L'activation de mTORC1 pourrait dépendre d'ATF6 dans certains cas. C'est un facteur essentiel pour l'adaptation de cellules quiescentes de carcinomes épidermoïdes cutanés à la rapamycine et au stress nutritionnel (Schewe et Aguirre-Ghiso 2008). Dans ces cellules tumorales quiescentes, ATF6 induit la survie via l'augmentation de l'expression de Rheb et l'activation de mTORC1, indépendamment d'Akt. Si une délétion d'ATF6 ou de Rheb est faite, les cellules dormantes deviennent alors sensibles à la rapamycine, qui entraine leur mort *in vivo*. Ainsi, ATF6 est une voie de survie pour les cellules tumorales quiescentes et sa délétion rend les cellules sensibles à la rapamycine.

Il a donc été démontré que chacune des voies de l'UPR peut interagir avec mTORC1. En revanche, selon le modèle d'étude, les interactions et leurs conséquences pour la cellule sont différentes.

6.2. mTORC2 et UPR

Il existe moins d'études explorant l'interaction entre mTORC2 et l'UPR.

Il a été démontré que l'induction pharmacologique du SRE dans les cellules de foie de souris par la tunicamycine ou la thapsigargine entraine la phosphorylation de la sous-unité rictor (sérine1235) via la protéine GSK3β (glycogen synthase kinase-3β). Cette phosphorylation de mTORC2 empêche la liaison d'Akt et sa phosphorylation (C.-H. Chen et al. 2011).

Une autre étude récente a démontré que l'inhibition génétique ou catalytique de mTORC2 induisait la phosphorylation d'eIF2α (Tenkerian et al. 2015). Dans les cellules MEF dont le gène pour TSC1/2 est muté, mTORC1 est constitutivement activé et Akt et mTORC2 sont inhibés (rétrocontrôle négatif). Dans ce contexte, il existe une augmentation de l'activité de PERK, qui peut être diminuée par la réactivation d'Akt. Dans ces cellules, l'inhibition de la voie PERK augmente l'apoptose en condition de SRE. Ainsi, la voie PERK/eIF2α est une importante voie de survie dans les conditions où Akt et mTORC2 sont inhibés. D'autre part, dans les cellules de fibrosarcome humain HT1080 traitées par des inhibiteurs de mTOR (rapamycine, Torin-2 ou KU0063794) on observe une augmentation de la phosphorylation d'eIF2α, via l'inhibition de mTORC2. En effet, une délétion génétique de mTORC1 n'a pas d'effet sur la phosphorylation d'eIF2α, alors que la délétion de mTORC2 induit l'activation

de PERK/eIF2α. On peut donc supposer que lorsque la voie mTORC1 est suractivée dans les cellules cancéreuses, la forte inhibition de mTORC2 et d'Akt due au rétrocontrôle négatif conduit à l'activation de la voie PERK/eIF2α. De ce modèle, l'activation de la voie PERK/eIF2α est en faveur de la survie car son inhibition par GSK2656157 augmente le pourcentage de mort cellulaire en condition de SRE induit par la thapsigargine (Tenkerian et al. 2015).

De plus, une fraction significative de mTORC2 se trouve sur les membranes du RE et est affectée par la stimulation par des facteurs de croissance, ce qui pourrait faciliter les interactions avec des protéines de l'UPR (Boulbes, Shaiken, et Sarbassov 2011).

L'étude de la relation entre la voie mTOR et l'UPR est complexe, car l'un peut agir sur l'autre et inversement suivant les modèles cellulaires et le type d'activation ou d'inhibition. Actuellement, il n'existe pas de données claires sur les effets de l'interaction entre l'UPR et la voie mTOR, qui pourront être soit bénéfiques soit délétères pour la cellule cancéreuse.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Nous avons vu, dans une première partie, les progrès qui ont été faits dans le traitement des NNE GEP, notamment des TNE pancréatiques, grâce à l'essor des thérapies ciblées. Néanmoins, ces thérapies n'induisent qu'une stabilisation de la pathologie, et les cas de rémissions restent rares. Les résistances aux inhibiteurs de mTOR participent à la limitation de leur efficacité thérapeutique. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques pour ces tumeurs.

Dans une deuxième partie, nous avons décrit l'émergence de l'UPR comme cible thérapeutique dans le cancer, avec des résultats concluants sur le myélome multiple en particulier, et de nombreuses molécules en phase d'études précliniques ou cliniques dans d'autres types tumoraux. Cependant l'étude de l'UPR dans les NNE GEP n'en est qu'à ses débuts et ne concerne pour le moment que les TNE pancréatiques.

L'objectif de ce travail est d'identifier s'il existe un intérêt à cibler l'UPR dans le traitement des patients atteints de NNE GEP. Nous avons utilisé deux lignées cellulaires de NNE gastro-intestinaux (NNE GI), la lignée STC-1 et la lignée GluTag. La lignée STC-1 a été isolée à partir d'une tumeur de l'intestin grêle développée chez une souris double transgénique (RIP1Tag2/RIP2PyST1) (Rindi et al. 1990). Ces cellules conservent la capacité à sécréter différentes hormones, notamment le GLP (glucagon-like peptide), le GIP (gastric inhibitiory peptide), la somatostatine, la neurotensine, la substance P et la cholécystokinie. La lignée GluTag provient d'une tumeur du côlon développée chez une souris transgénique (GluTag). Elles sécrètent principalement le glucagon, le GLP et la cholécystokinine (Drucker et al. 1994). Ces deux lignées sont tumorigènes chez la souris nude (Pourreyron et al. 2008; Couderc et al. 2011). Les tumeurs développées par ces lignées chez la souris se rapprochent des CNE humains de par leur similarité architecturale, morphologique et leur forte capacité de prolifération (Bollard et al. 2013).

Nous avons étudié *in vitro* l'activation de l'UPR et la relation entre l'UPR et la voie mTOR, connue pour être activée dans ces cellules. Grâce à un modèle murin de développement métastatiques de NNE GI, nous avons étudié l'impact de la modulation de la réponse UPR sur le développement de métastases hépatiques *in vivo* afin d'identifier de nouvelles molécules pour traiter les NNE GI.

Ainsi ces travaux visent à élargir le champ de thérapies existantes afin de diversifier l'arsenal thérapeutique destiné aux NNE GEP, particulièrement d'origine gastro-intestinale, en cherchant à cibler un mécanisme pouvant être impliqué aussi bien dans la survie des cellules cancéreuses que dans leur mort, l'UPR.

RESULTATS

mTOR inhibitors activate PERK signaling and favor viability of gastrointestinal neuroendocrine cell lines

Freis Patricia, Bollard Julien, Lebeau Justine, Massoma Patrick, Fauvre Joëlle, Vercherat Cécile, Walter Thomas, Manié Serge, Roche Colette, Scoazec Jean-Yves, Ferraro-Peyret Carole

Publié dans *Oncotarget*, 2017, DOI: 10.18632/oncotarget.15469

mTOR inhibitors activate PERK signaling and favor viability of gastrointestinal neuroendocrine cell lines

Freis Patricia[1,2], Bollard Julien[1], Lebeau Justine[1], Massoma Patrick[1], Fauvre Joëlle[1], Vercherat Cécile[1], Walter Thomas[1,3], Manié Serge[1], Roche Colette[1], Scoazec Jean-Yves[4,5], Ferraro-Peyret Carole[1,2]

[1]Univ Lyon, Claude Bernard University, Cancer Research Center of Lyon, INSERM U1052, CNRS UMR5286, Faculty of Pharmacy, F-69008, Lyon, France

[2]Hospices Civils de Lyon, Molecular Biology of Tumors, GHE Hospital, F-69500, Bron, France

[3]Hospices Civils de Lyon, Digestive Oncology, Hospital E Herriot, F-69432, Lyon, France

[4]Institut Gustave Roussy, Biopathology, F-94800 Villejuif, France

[5]Univ Paris Sud, F-91400 Orsay, France

Correspondence to: Carole Ferraro-Peyret, **email:** carole.ferraro-peyret@univ-lyon1.fr
Jean-Yves Scoazec, **email:** jean-yves.scoazec@gustaveroussy.fr

Keywords: *mTOR, UPR, PERK, neuroendocrine cell lines, GI-NET*

Received: *June 15, 2016* ***Accepted:*** *February 06, 2017* ***Published:*** *February 18, 2017*

ABSTRACT

mTOR and Unfolded Protein Response (UPR) are two signaling pathways frequently activated in cancer cells. The mTOR pathway has been shown to be up-regulated in most gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. In contrast, little is known about the UPR status in neoplastic neuroendocrine cells. However, these hormone-producing cells are likely to present distinctive adaptations of this pathway, as other secretory cells. We therefore analyzed the status of the three axes of UPR and their relation to mTOR pathway in two gastrointestinal neuroendocrine tumors (GI-NET) cell lines STC-1 and GluTag. At baseline, pharmacological inducers activate the three arms of UPR: PERK, ATF6 and IRE1. Although hypoxia stimulates the PERK, ATF6 and IRE-1 pathways in both cell lines, glucose depletion activates UPR only in STC-1 cell line. Strikingly, P-p70S6K1 increases concomitantly to P-PERK and BiP in response to thapsigargin treatment, glucose depletion or hypoxia. We found that different mTOR inhibitors activate the PERK signaling pathway. To confirm that mTOR inhibition modulates PERK activation, we inhibited PERK and showed that it decreased cell viability when associated to mTOR inhibition, indicating that mTOR drives a PERK-dependent survival pathway. In conclusion, in GI-NET cell lines, UPR signaling is functional and PERK arm is induced by mTOR inhibition. These observations open up new perspectives for therapeutic strategies: the crosstalk between mTOR and UPR might contribute to the resistance to mTOR inhibitors and could be targeted by mTOR and PERK inhibitors in combination therapy.

INTRODUCTION

Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NET) are neoplastic lesions of epithelial origin. Most of them are well-differentiated and retain the structural and functional characteristics of normal peptide-secreting endocrine cells, including the capacity to synthesize and/or secrete one or several hormones. The mechanisms of hormone synthesis and secretion in neoplastic neuroendocrine cells are similar to those operating in normal peptide-secreting endocrine cells and are controlled through the same regulatory pathways. One of these pathways is known as the unfolded protein response (UPR). In response to intrinsic or extrinsic stress inducers, UPR transiently inhibits protein synthesis and induces the production of chaperone molecules in order to restore the homeostasis of the endoplasmic reticulum (ER) and to promote cell survival [1]. The failure of this rescue mechanism results in apoptotic cell death [2]. Three ER stress transducers, controlling three distinct axes of UPR, have been identified so far. Each branch is defined by a class of transmembrane ER-resident signaling components:

IRE1 (inositol requiring enzyme 1), PERK (double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)–like ER kinase), and ATF6 (activating transcription factor 6) [3].

Despite the importance of ER homeostasis in peptide-producing endocrine cells, little is known about UPR status and regulation in neoplastic neuroendocrine cells. UPR status has been investigated in the insulin-producing pancreatic neuroendocrine cell line INS-1 [4]. UPR activation through ATF6 has been shown to promote INS-1 survival [5, 6]. In contrast, ER stress inducers like thapsigargin, bortezomib and brefeldin A, have been shown to induce apoptosis in the human neuroendocrine cell line BON-1 and in the murine pancreatic cell line INS-1E [7, 8].

In addition to its direct impact on cell survival in response to stress, UPR might also have indirect effects. Recent results show that, in several cell types, UPR interacts with the mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) pathway [9–12]. Like UPR, the mTOR pathway, and particularly mTORC1, is involved in the response to stress and is able to promote either cell survival or apoptosis through various mechanisms. mTORC1 and PERK are co-regulated to coordinate the inhibition of protein synthesis and autophagy process when cells have to face energy depletion [13]. This co-regulation can rely on RHEB-GTP that is more available for PERK activation when mTORC1 is inactive [14]. Conversely, *Tsc1* loss in oligodendrocytes lineage leads to mTOR activation, an excessive protein translation and subsequent UPR activation through PERK–eIF2α signaling axis and Fas–JNK apoptotic pathways [15]. The UPR, and particularly PERK, is described to regulate PI3K-AKT-mTORC1 axis by activating AKT [16], increasing AMPK activity [17] or inactivating TSC2 [18]. Therefore, depending on the cell type, mTORC1 can act upstream or downstream of UPR, which can itself favor or antagonize the anabolic effects of mTORC1 [19].

The possible interplay between the UPR and the mTOR pathways might have important functional consequences in GEP-NET since the mTOR pathway is involved in their tumorigenesis. Recent sequencing studies of pancreatic and small intestinal NET showed that respectively 14 % and 33 % of cases harbor mutations in at least one gene encoding for mTOR pathway components [20, 21]. The importance of the mTOR pathway in GEP-NET is further underlined by the significant anti-tumor effects shown by the mTOR inhibitor everolimus, now used in the treatment of advanced NET [22, 23]. We therefore hypothesized that interactions between UPR and mTOR pathways might amplify the effects of mTOR on neuroendocrine cell growth and survival and might even represent a possible mechanism of resistance to mTOR inhibitors. To test this hypothesis, we decided to investigate UPR status in 2 gastrointestinal (GI)-NET cell lines and to assess their behavior and response to mTOR inhibitors using either pharmacological or metabolic stress, i.e. glucose depletion and hypoxia. We found that the three axes of UPR can be differentially activated in GI-NET cell lines, depending on the stress applied, and that mTOR inhibition is associated with an activation of PERK pathway that favors cell viability.

RESULTS

The three axes of the UPR are inducible by ER stress in GI-NET cell lines

As UPR has never been investigated in GI-NET, we first studied the status of the three UPR pathways, in STC-1 and GluTag cells, in basal conditions and after ER stress induction by three different mechanisms: inhibition of the sarcoplasmic/endoplasmic Ca^{2+}-ATPase, blockade of N-linked glycosylation or ER to Golgi protein trafficking, using thapsigargin (Tg), tunicamycin (Tn) or brefeldin A (Bref A), respectively. As shown in Figure 1A in control conditions, activation of PERK-eIF2α axis was higher in STC-1 than in GluTag cells, as demonstrated by P-PERK and P-eIF2α. When STC-1 and GluTag cells were treated with Tg or Bref A, an activation of the PERK-eIF2α axis was observed and associated to an increased expression of the UPR pro-apoptotic target gene: CHOP. This result correlated to the cleavage of the proapoptotic factor caspase 3 (Figure 1A), indicates a functional apoptotic pathway triggered by the UPR induction. Nevertheless, after Tg treatment, PERK was less activated in GluTag cells than in STC-1 cells, with only a 3-fold increase of band density in GluTag cells compared to a 30-fold increase in STC-1 cells.

Similar amount of BiP (Figure 1A) and nuclear localization of ATF6 were observed in both cell lines in control conditions (Figure 1C and 1D). The basal nuclear ATF6 in STC-1 cell lines was confirmed using sub-fractionation (Supplementary Figure 1). STC-1 cells treated with UPR inducers showed an increase in BiP expression, which mainly reflects the activation of the ATF6 branch [24], compared to control (Figure 1A and 1B). In GluTag cells, only Tn treatment induced BiP expression (Figure 1A and 1B). Each of the three UPR inducers significantly increased the nuclear localization of ATF6 in STC-1 cells (Figure 1C and 1E), whereas only Tg and Bref A significantly increased ATF6 nuclear staining in GluTag cells (Figure 1D and 1E).

The third axis of UPR controlled by IRE-1, was investigated by monitoring the splicing of XBP1 (XBP1-s) at both RNA and protein levels (Figure 1A and 1F, Supplementary Figure 2A). This axis was activated by the three UPR-inducers, as shown by the detection of the spliced form of XBP-1 at the mRNA and the protein levels (Figure 1F and Supplementary Figure 2A, respectively).

UPR pathways were also investigated when cells were subjected to hypoxia or metabolic stress. STC-1 and GluTag

cell lines were cultured in 1% O_2 or in low glucose media (i.e. 1 or 5 mM vs 25 mM glucose) for 24 h (Figure 2).

Hypoxic conditions led to the phosphorylation of PERK and eIF2α and to the increased expression of ATF4 and CHOP in both cell lines (Figure 2A and Supplementary Figure 3A). BiP expression was also induced in both cell lines, suggesting a sustained activation of ATF6 branch (Figure 2A). Regarding the activation of IRE1 axis, hypoxia triggered the XBP1 splicing in both cell lines (Figure 2B and Supplementary Figure 2B).

In response to glucose depletion, a phosphorylation of PERK was also observed in both STC-1 and GluTag cell lines (Figure 2C). Nevertheless, the activation of PERK pathway was associated with the phosphorylation of eIF2α and the increase of ATF4 in the STC-1 cell line only. BiP expression was also induced in the two cell lines (Figure 2C, Supplementary Figure 3B). These data are supported by the accumulation of active ATF6 in the nucleus in STC-1 cells following glucose deprivation (Figure 2E and 2F). The splicing of XBP1 (mRNA or protein level) was not induced by glucose depletion in both cell lines (Figure 2C and 2D, and Supplementary Figure 3C).

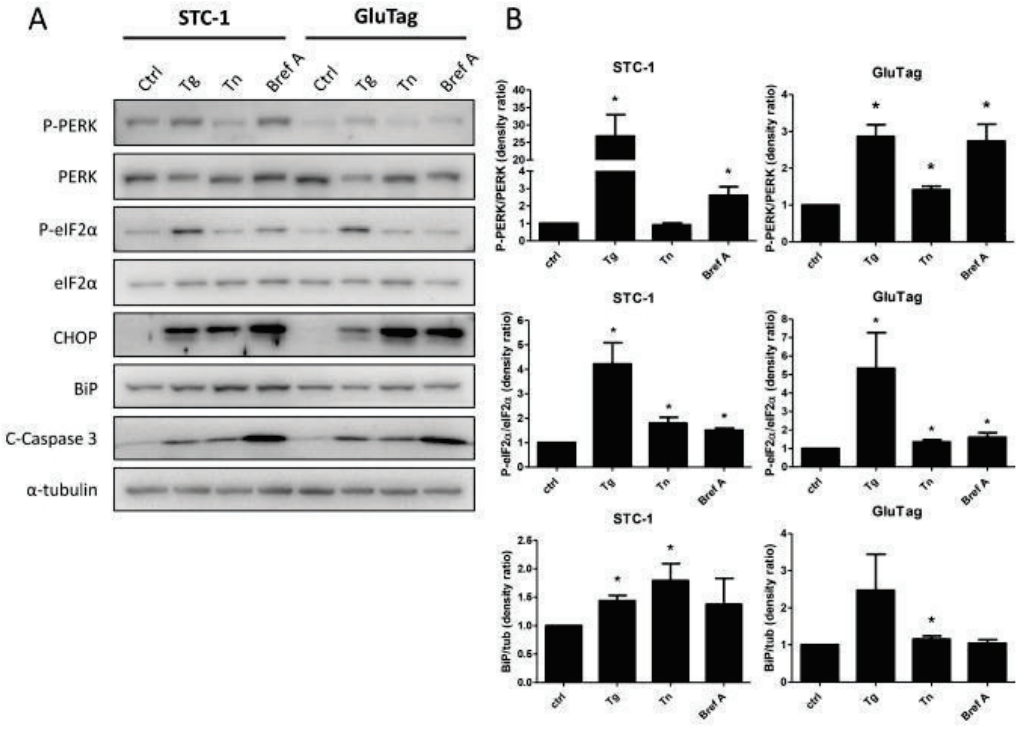
Altogether, these results showed that STC-1 and GluTag cell lines were able to activate the three axes of the ER stress after treatment with UPR inducers or in response to hypoxia. After 24 h of glucose depletion, only PERK and ATF6 arms were activated in STC-1 cell line whereas such conditions did not activate the UPR in GluTag cell line.

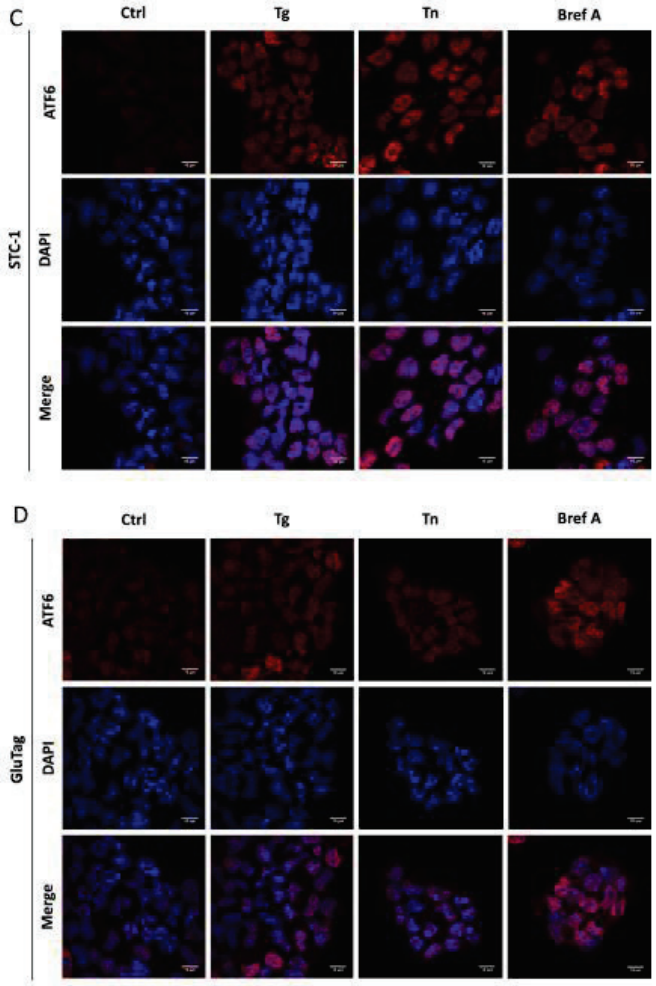
Induction of UPR and mTORC1 pathways are concomitant in GI-NET cell lines

As mTORC1 is known to activate ER stress in tuberous sclerosis [25] and diabetes [10, 26, 27] and to be strongly activated in GEP-NET, we investigated the activation of mTORC1 pathway on UPR activation.

When STC-1 or GluTag cells were treated with the ER stress inducer Tg for 4h, the phosphorylation of two effectors of mTORC1: p70S6K1 and 4E-BP1, increased in both STC-1 and GluTag cells (Figure 3A). mTORC1 activation was concomitant with PERK phosphorylation in both cell lines and with an increase of BiP expression statistically significant in STC-1 cell line only (Figure 3A and Supplementary Figure 4).

After 24 h of shortage of either oxygen or glucose, comparable results were observed, with a phosphorylation of p70S6K1 and 4E-BP1, as well as UPR-related markers P-PERK, and the induction of BiP. CHOP and XBP1-s expressions were detectable only in cells cultured in 1% O_2 but not in low glucose (Figure 3B and 3C).




C
Ctrl
Tg
Tn
Bref A
STC-1
ATF6
DAPI
Merge
D
Ctrl
Tg
Tn
Bref A
GluTag
ATF6
DAPI
Merge

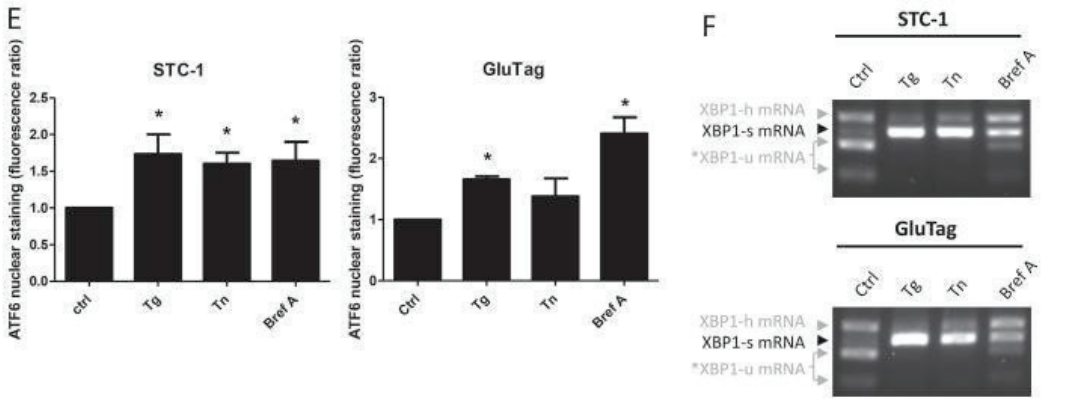

E
STC-1
ATF6 nuclear staining (fluorescence ratio)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ctrl
Tg
Tn
Bref A
GluTag
ATF6 nuclear staining (fluorescence ratio)
3
2
1
0
Ctrl
Tg
Tn
Bref A
F
STC-1
Ctrl
Tg
Tn
Bref A
XBP1-h mRNA
XBP1-s mRNA
*XBP1-u mRNA
GluTag
Ctrl
Tg
Tn
Bref A
XBP1-h mRNA
XBP1-s mRNA
*XBP1-u mRNA

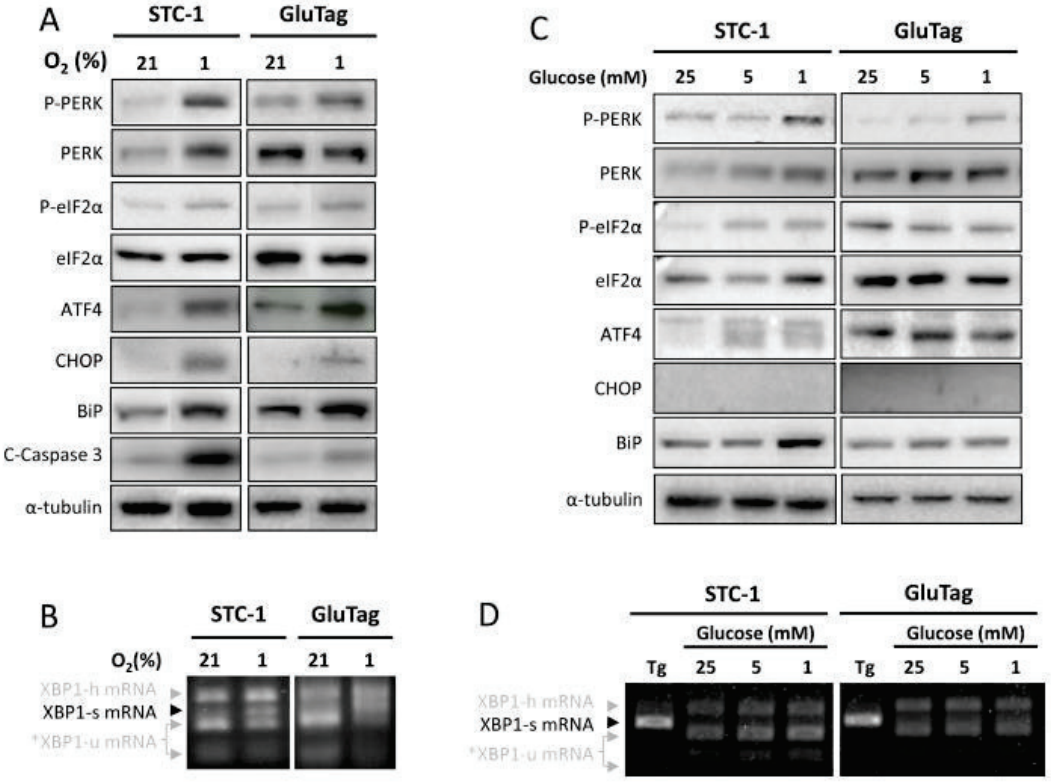
Figure 1: UPR status in STC-1 and GluTag cell lines and effect of UPR inducers on markers of the UPR pathways. STC-1 and GluTag cells were incubated in medium (Ctrl) or ER stress-inducing agents thapsigargin (Tg, 300 nM), tunicamycin (Tn, 0.05 µg/mL) and brefeldin A (Bref A, 3 µM) for 4 h, 16 h and 8 h respectively. (**A**) Protein expression level of phosphorylated or total forms of PERK, eIF2α and CHOP, BiP and cleaved-caspase 3 (C-Caspase 3) protein expression was examined using Western Blot analysis. α-tubulin was used as internal control (**B**) Densitometric quantification of P-PERK/PERK, P-eIF2α/eIF2α and BiP/α-tubulin ratios analysis in STC-1 or GluTag cell lines (*$P < 0.05$ versus control). (**C**–**D**) The effect of Tg, Tn and Bref A on ATF6 nuclear localization was assessed by immunofluorescence in STC-1 cells (C) and GluTag cells (D) using anti-ATF6 antibody and hoechst dye. Magnification ×1000. (**E**) Bar graphs obtained by quantification of ATF6 nuclear staining (*$P < 0.05$ versus control). (**F**) XBP1 mRNA splicing was analyzed by RT-PCR after Pst1 digestion: XBP1-h, hybride, XBP1-u, unspliced; XBP1-s, spliced variant of XBP1; *, XBP1-u mRNA fragments after Pst1 digestion. Results are presentative of 3 independent experiments (A, C, D, F) or the mean ± S.E.M. of an experimental $n = 3$ (B, E).

Altogether, these results revealed that after 24 h of metabolic stress or hypoxia, STC-1 and GluTag cell lines concomitantly activated mTORC1 and PERK signaling pathways.

Inhibition of mTORC1 leads to the selective induction of PERK pathway in GI-NET cell lines

We wondered whether mTORC1 could modulate UPR in GI-NET cell lines or not. To address this question, in STC-1 cells, mTORC1 pathway was either activated with IGF-1 (3 nM) or inhibited using rapamycin (10 nM), for 24 h. The expression profile of UPR and mTOR pathway-related proteins was analyzed (Figure 4A). As expected, IGF-1 induced mTORC1 signaling pathway by increasing phosphorylation of p70S6K1 and 4E-BP1. UPR proteins such as P-PERK and BiP were also induced. However, CHOP expression remained undetectable. Finally, IRE-1 axis was not activated with IGF-1 treatment, as the spliced form of XBP-1 was not augmented.

The addition of rapamycin to IGF-1-treated cells suppressed mTORC1 activation, as shown by the absence of p70S6K1 phosphorylation and the decrease of 4E-BP1 phosphorylation. In this condition, we also observed a phosphorylation of PERK (Figure 4A). This activation was associated to a phosphorylation of eIF2α, whereas CHOP was not detectable.



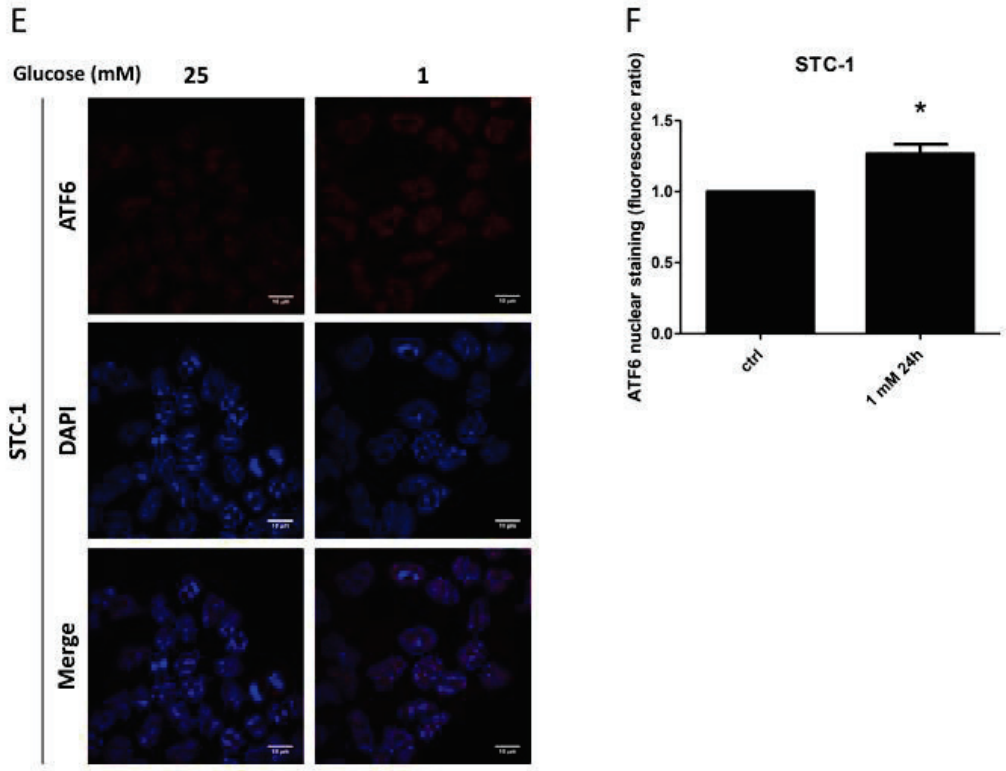


Figure 2: Activation of the UPR during hypoxia or glucose depletion. STC-1 and GluTag cells were subjected to hypoxia (1%) or cultivated with decreasing concentration of glucose i.e. 25, 5 or 1 mM, for 24 h. (**A**) and (**C**) Protein expression level of phosphorylated and total forms of PERK, eIF2α and ATF4, CHOP, BiP and C-Caspase 3 protein expression was examined using immunoblots, during hypoxia (A) and glucose depletion (C). α-tubulin was used as internal control. Blots of Figure 2A have been performed on the same electrophoresis gel, but cut and reconstituted. (**B**) and (**D**) XBP1 mRNA splicing was analyzed by RT-PCR after Pst1 digestion: XBP1-u, unspliced; XBP1-h, hybrid; XBP1-s, spliced variant of XBP1; *, XBP1-u mRNA fragments after Pst1 digestion. (**E**) ATF6 nuclear localization was assessed in STC-1 cells using immunofluorescence with anti-ATF6 antibody and hoechst dye. Magnification x1000. Results are presentative of at least 3 independent experiments (A–E). (**F**) Bar graphs were obtained by quantification of ATF6 nuclear staining (*$P < 0.05$ versus control). Results are presentative of 3 independent experiments (A–E) or the mean ± S.E.M. of an experimental $n = 3$ (F).

As mTOR pathway is already activated at baseline, we studied the effect of rapamycin on UPR without adding IGF-1 to the culture media (Figure 4B–4E). After 1 h of treatment, the activation of PERK-eIF2α-ATF4 axis was observed in STC-1 cells. However CHOP was not expressed (Figure 4B). PERK activation was maintained after 24 h, in both STC-1 and GluTag cells (Figure 4C and Supplementary Figure 5A and 5B). The two other axes of UPR, IRE-1 and ATF6, were not activated by rapamycin as neither XBP1-s nor BiP expressions were modified, after 1h of treatment (Figure 4B) or from 2 to 24 h (Supplementary Figure 5A and 5B). Furthermore in STC-1 cells, the nuclear localization of ATF6 was not altered by rapamycin treatment (Figure 4D and 4E).

We then monitored UPR status following short period of rapamycin exposure. A quick phosphorylation of PERK and a consecutive phosphorylation of eIF2α occurred after 20 minutes (Figure 5A). The expression of ATF4 was increased after 30 min of rapamycin treatment and then decreased, probably due to the action of negative feedback loops. The exposure to rapamycin, as for the other duration of treatment, did not lead to the increase of CHOP, BiP or GADD34 expression (Figure 5A).

Three other mTOR inhibitors, namely GSK2126458 (100 nM), PP242 (1 μM) or WYE125132 (100 nM), were tested (Figure 5B). All the three drugs completely inhibited p70S6K1 phosphorylation and rapidly induced PERK and eIF2α phosphorylation, i.e. 10 min to 30 min of treatment. PERK remained phosphorylated up to 60 min with PP242 and WYE125132 treatments, whereas it decreased after 30 min with GSK2126458 treatment.

Altogether, these results showed that mTORC1 inhibition mostly impact on one axis of UPR. Indeed,

when treated with mTORC1 inhibitors, GI-NET cell lines activated PERK pathway, whereas IRE-1 axis and BiP status were not modified.

The activation of PERK pathway with rapamycin increases cell viability

As PERK pathway determines cell fate, depending on the duration and the intensity of its activation [28], we wonder if its activation after mTOR inhibition can modify cell viability.

We therefore treated STC-1 cell line either with rapamycin or with an inhibitor of PERK phosphorylation: GSK2656157 or both drugs for 24 h. mTOR inhibition by rapamycin significantly decreased cell viability by 27% after 24 h of treatment ($p < 0.001$) (Figure 6A). PERK inhibitor GSK2656157 alone had no significant effect as well as combined with rapamycin (Figure 6A). However, in GI-NET, mTOR is overactivated [29], so to mimic this tumoral feature we evaluated the efficacy of the combination in two context of mTORC1 activation, i.e. IGF-1 treatment and glucose depletion. When STC-1 cells proliferation and mTOR pathway were stimulated by the growth factor IGF-1, rapamycin significantly decreased cell viability (30%, $p < 0.001$). GSK2656157 had no effect on cell viability, whereas the combination of both drugs decreased significantly cell viability compared to rapamycin condition (40% *vs* 30%, $p < 0.001$, Figure 6B and Supplementary Figure 6). When cells were cultured in 1 mM glucose, rapamycin alone induced a significant fall of cell viability (31%, $p < 0.001$) whereas GSK2656157 had still no effect (Figure 6C). The combination of both drugs significantly decreased cell viability compared to rapamycin alone (50% *vs* 31%, $p < 0.001$).

All these data show that the co-inhibition of the mTORC1 and PERK pathways decreases cell viability in a context of mTORC1 activation.

DISCUSSION

We here demonstrated that neoplastic GI-NET cells, subjected to stressful conditions such as hypoxia or glucose depletion, are able to simultaneously activate mTOR and UPR pathways. We also showed that mTOR inhibition by therapeutic agents resulted in the activation of the PERK axis of UPR.

UPR is known to play various physiological roles in both normal and neoplastic peptide-producing endocrine cells. Several concurrent studies on pancreatic cell function demonstrated that UPR is necessary for cell survival, hormone synthesis and secretion in β-pancreatic cells or insulinoma-derived cell lines [4, 30]. Recently, Hassler *et al.* [31] also showed that secretion of insulin depends on the activation of XBP1s–dependent

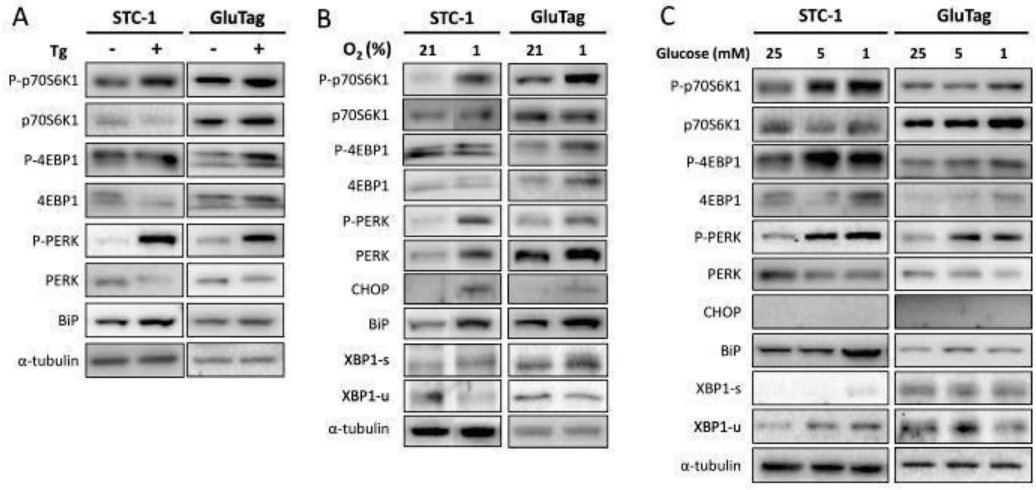


Figure 3: Glucose depletion or hypoxia induced a concomitant induction of UPR and mTORC1 pathways. Cells were cultivated in 25 mM glucose media. (**A**) Total protein extracts prepared from STC-1 or GluTag cells treated for 4 h with 300 nM thapsigargin (Tg) were subjected to Western Blot analysis using specific antibodies either for the markers of mTOR pathway: p70S6K1 and 4E-BP1, or for UPR proteins: PERK and BiP. α-tubulin was used as internal control. (**B**) The effect of hypoxia (1% O_2) was assessed at 24 h on the phosphorylation of p70S6K1, 4E-BP1 and PERK, CHOP, BiP, XBP1-s and XBP1-u protein expression. Blots of Figure 3B have been performed on the same electrophoresis gel, but cut and reconstituted (except for XBP1 protein). (**C**) Cells were cultivated in 25, 5 or 1 mM glucose media for 24 h. Protein extracts were used for western blotting with antibodies against the indicated proteins. α-tubulin was used as internal control. Results are representative of at least 3 experiments.

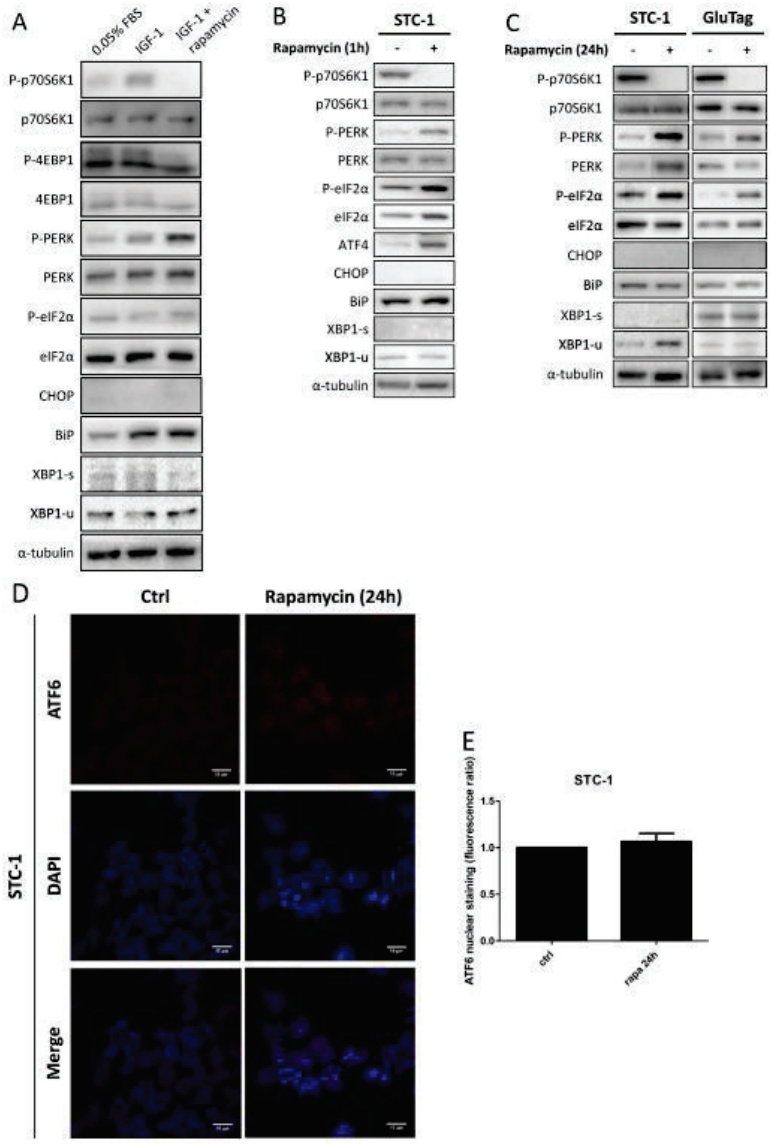


Figure 4: Effect of rapamycin on markers of the UPR pathways. (**A**) Cells were incubated in medium alone (0.05% FBS), with 3 nM IGF-1 or with both 3 nM IGF-1 and 10 nM rapamycin (IGF-1 + rapamycin). Total protein extracts prepared from cells incubated for 24 h in those conditions were subjected to Western Blot analysis. Protein expression levels were assessed for phosphorylated or total forms of PERK, eIF2α and for CHOP, BiP, XBP1-s and XBP1-u proteins. Efficiency of rapamycin to inhibit mTORC1 pathway was also checked by immunoblot with phosphorylated and total forms of p70S6K1 and 4E-BP1. α-tubulin was used as internal control. (**B** and **C**) Cells were incubated with 10nM rapamycin for 1 h (B) or 24 h (C). Immunoblots for phosphorylated and total forms of PERK, eIF2α, p70S6K1 and 4E-BP1 or for ATF4, CHOP, BiP, XBP1-s and XBP1-u protein expression were performed. α-tubulin was used as internal control. Blots of P-p70S6K1, p70S6K1, P-PERK, PERK, and α-tubulin of Figure 4B and blots of Figure 4C have been performed on the same electrophoresis gel, but cut and reconstituted. (**D**) Cells were incubated in medium alone (Ctrl) or with 10 nM rapamycin for 24 h. Nuclear localization of ATF6 was assessed using immunofluorescence with ATF6-antibody (red) and Hoechst dye. Magnification ×1000. (**E**) Bar graphs were obtained by quantification of ATF6 nuclear staining. Results are representative of at least 3 experiments.

secretive genes. Indeed, IRE1 is a determinant pathway [32] for pancreatic β-cell survival, while PERK and its downstream effector CHOP are associated to β-cell death [33]. The activation of UPR has not been described in GI-NET cell lines, nor in human GI-NET yet. As well-differentiated neuroendocrine tumors still synthetize and secrete a large amount of neuroendocrine peptides [34], we might extrapolate that neuroendocrine tumor cells may activate UPR to maintain ER homeostasis and prevent the accumulation of unfolded proteins.

In the present study, we observed the expression of PERK, ATF6 and IRE1 axes components in two cell lines derived from GI-NET, STC-1 and GluTag, both known to be highly secretory cells [35, 36]. Nonetheless, the activation of PERK axis did not lead to the expression of CHOP, a pro-apoptotic protein downstream of PERK axis, suggesting that the activation of PERK pathway is too weak to induce apoptotic pathway. When we assessed the effect of three different UPR inducers, Tg, Tn or Bref A, IRE-1 and ATF6 axes were strongly induced by the three drugs. The effect of these drugs on PERK axis varied, depending on the drug and cell types. In both cell lines, Tg and BrefA induced PERK axis, while Tn significantly induced PERK axis in GluTag cells only. These differences can be explained by the three distinct mechanisms of action of these drugs. Finally, pharmacological induction of ER stress resulted into cell apoptosis, as both cell lines strongly expressed pro-apoptotic CHOP and cleaved-caspase 3 proteins when treated with Tg, Tn or Bref A, suggesting that a high level of ER stress led to cell death.

During tumor growth, two types of stress are known to induce UPR, namely glucose depletion and hypoxia. These stressful factors force tumor to adapt in order to survive until the organization of neovascularization provides nutrient and oxygen supplies. When exposed to hypoxia, both cell lines activated the three axes of UPR, which led to increased CHOP expression and consequent caspase 3 cleavage. In contrast, after 24 h of glucose depletion, only STC-1 cell line activated PERK axis, without inducing CHOP. These results suggest that GI-NET cell lines are more sensitive to oxygen deprivation than to glucose decrease. PERK appears to be a key pathway in neuroendocrine cells. PERK is known to be pivotal for cell adaptation to ER stress, promoting either survival or apoptosis. Indeed, on one hand, in order to re-establish ER homeostasis, PERK is able to: (a) decrease cellular anabolic requirements by inhibiting cell proliferation thanks to cyclin D1 downregulation, (b) inhibit Cap-dependent translation protein and therefore decrease protein load within the ER, (c) maintain redox homeostasis via Nrf2 transcription and (d) upregulate the transcription factor ATF4 in order to induce the expression of prosurvival genes. On the other hand, PERK may promote apoptosis after prolonged or chronic activation as the permanent nuclear localization of ATF4 induces the expression of the proapoptotic factor CHOP [28].

mTOR and UPR have been shown to act coordinately in a number of biological processes [19]. In our study, when we investigated mTORC1 expression after metabolic stress, we observed a concomitant activation of mTORC1, PERK, BiP and XBP1-s in hypoxia conditions, and a concomitant activation of mTORC1, PERK and BiP in glucose depletion conditions. STC-1-cells treatment with IGF-1, which activate mTORC1 pathway, resulted in a concomitant up-regulation of mTORC1, PERK and BiP. To assess whether PERK activation and BiP expression

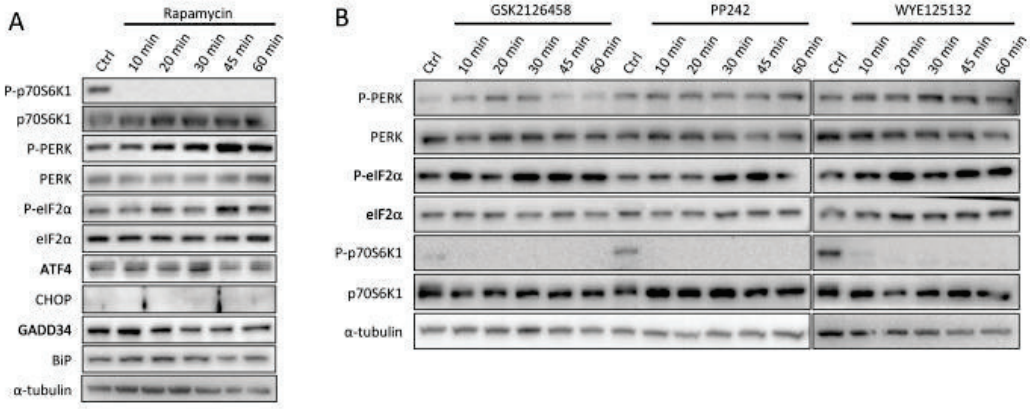


Figure 5: Induction of PERK pathway at early times of mTOR inhibitors treatments. (**A**) Cells were cultured in medium alone (Ctrl) or with 10 nM rapamycin for 10 to 60 minutes. Protein expression levels were checked by immunoblot for phosphorylated and total forms of p70S6K1, PERK, eIF2α, and for ATF4, CHOP, GADD34 and BiP protein expression. (**B**) Effect of mTOR inhibitors on PERK activation. Cells were cultured in medium alone (Ctrl) or with specific inhibitors of mTOR: GSK2126458 (10 nM), PP242 (1 μM) or WYE125132 (100 nM) for 10 to 60 minutes. Total protein extracts were subjected to Western Blot analysis using specific antibodies against the indicated protein. α-tubulin was used as internal control. Results are representative of 3 experiments.

depend on mTORC1 activation, cells were treated with rapamycin. Unexpectedly, addition of rapamycin in STC-1 cells did not reversed PERK phosphorylation nor BiP expression. In contrast, in both cell lines, rapamycin treatment strongly and quickly up-regulated PERK axis, i.e. after 20 minutes of treatment. This was confirmed using other mTORC1 inhibitors which do not interfere with the stability of mTORC1 but are ATP-competitive inhibitors. Tyagy et al. recently described in HEK293 cell line that RHEB, an essential upstream activator of mTORC1, is more available when mTORC1 is inhibited and could thereby promote PERK activation [14]. mTORC2 can also regulate PERK/eIF2α axis, as it was recently showed in TSC2$^{-/-}$ MEF by Tenkerian *et al.* [11, 37]. Further investigations are required to understand whether such mechanisms are implicated in the activation of PERK when GI-NET cell lines are treated with mTORC1 inhibitors. We demonstrated that the combination of both mTOR inhibitor and PERK inhibitor decreased significantly cell viability, compared to mTOR inhibitor alone. This suggests that activation of PERK pathway with mTOR inhibitor is prosurvival. Those results suggest that targeting PERK axis activation could enhance effectiveness of mTOR inhibitor treatment in patients. More studies are needed to confirm these results in *in vivo* models of GEP NET.

As UPR can be activated and modulated in GI-NET cell lines, we also wonder whether it could behave as a therapeutic target. This option has been scarcely studied until now. Bortezomib, sanguinarine and brefeldin A have been described to decrease cell viability in the human pancreatic neuroendocrine BON-1 cell line [7]. Only one clinical trial has evaluated the effect of the UPR inducer bortezomib in 16 patients with various well-differentiated neuroendocrine tumors [38]. In this study, bortezomib did not induce any objective response but any definitive interpretation is precluded by the very small number of patients and the unknown profile of UPR or mTOR activation in treated tumors. Further studies are needed to analyze the UPR status and also to evaluate the effects of UPR inducers in GEP-NET.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

The STC-1 cell line, a gift of G. Rindi (Department of Pathology and Laboratory Medicine, Roma, Italy) and the GluTag cell line, a gift of D.Drucker (Department of Medicine, Mt Sinai Hospital, Toronto, Ont., Canada) are derived from neuroendocrine intestinal tumors developed in transgenic mice. Both cell lines retain the capacity to synthesize and secrete peptidic hormones and neuromediators [35, 36]. The MCF-7 cell line was purchased from the ATCC. Cells were routinely cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% for STC-1 and MCF-7 cells or 10% fetal bovin serum (FBS) for GluTag cells, 2 mM glutamine and antibiotics (100UI/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin), in 5% CO_2 and 37°C conditions.

Glucose depletion

Cells were seeded in 6-well plates (for protein extraction) or in 12-well plates (for immunofluorescence studies) and maintained 48 hours under normal culture conditions, i.e. 25 mM glucose concentration, 5% or 10% FBS, 5 % CO_2, 21% O_2. Glucose depletion was obtained by removing 25 mM glucose medium and adding fresh medium containing 5 mM or 1 mM glucose, for 24 h.

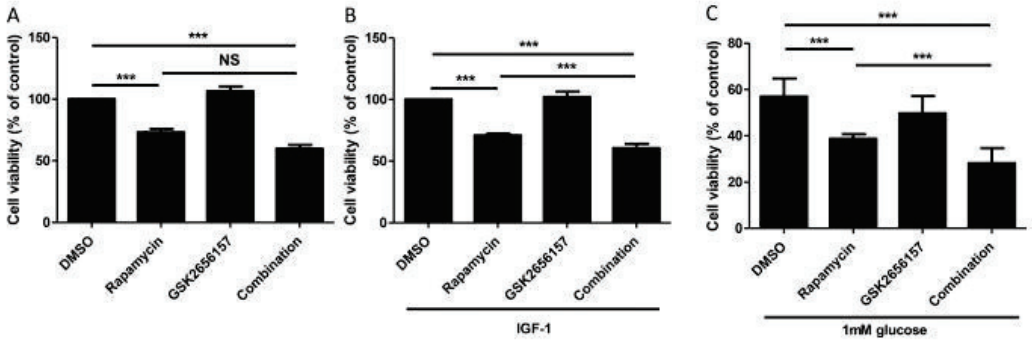


Figure 6: Effect of PERK Inhibitor GSK2656157 and rapamycin on cell proliferation, estimated by measuring the number of viable cells. (**A**) STC-1 cells were incubated with rapamycin (10 nM) or GSK2656157 (100 nM) or both for 24 hours, then viability was assessed using MTT test. (**B**) Cells were cultivated in 0.05% FBS overnight then incubated with exogenous IGF-1 at 3 nM and treated with rapamycin (10 nM) or GSK2656157 (100 nM) as described in A. (**C**) Cells were cultivated in 1 mM glucose medium for 24 h then treated with rapamycin (10 nM) or GSK2656157 (100 nM) as described in A. The graph shows the mean of at least 3 independent experiments ± S.E.M. Statistical analysis was performed using Holm-Sidak Test, $^{***}P < 0.001$.

Experiments were stopped by removing media; then, 6-well plates were washed 2 times with cold PBS for protein extraction, while 12-well plates were fixed with paraformaldehyde 4% for immunostaining.

Hypoxia

Cells were seeded in 6-well plates in normal culture conditions. After 48 h, cells were transferred to 1% O_2 environment, at 37°C and 5 % CO_2 for 24 h.

Cell proliferation assay

Cells were seeded at a density of 2000 cells per well in 96-well plates and maintained 72 h in normal culture conditions. The medium was then replaced by 5% FBS-containing DMEM medium with drugs (rapamycin or GSK2656157) alone or in combination for 24 h. A 10 uL sample of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution (5 mg/ml) was added to each well, and the plates were incubated at 37°C for 2 h. If cell proliferation was stimulated by IGF-1, the medium was firstly replaced by 0.05% FBS-containing DMEM medium with IGF-I for 24 h before drugs were added. The supernatant was discarded, and 100 uL of DMSO was added to dissolve formazan crystals, generating a blue-purple color. The absorbance was measured at 540 nm.

Reagents

Murine recombinant insulin-like growth factor-1 (IGF-1) was purchased from PeproTech (Rocky Hill, NJ). Thapsigargin was obtained from Applichem (St Louis, MO), tunicamycin from Sigma (St Louis, MO) and brefeldin A from TOKU-E (Bellingham, WA). mTOR and PERK inhibitors were purchased from LC Labs (Woburn, MA) (rapamycin), Selleckchem (Houston, TX) (WYE125132, GSK2656157), Abcam (Cambridge, UK) (PP242) and from GlaskoSmith and Kline (Middlesex, UK) (GSK2126458). Antibodies against phospho-PERK (Thr980) (No.3179), PERK (No. 3192), phospho-eIF2α (Ser51) (No. 3597), eIF2α (No.2103), phospho-p70S6K1^{thr389} (No. 9234), p70S6K1 (No. 9202) and cleaved-caspase3 (No. 9664) were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Phospho-4E-BP1 (phosphorylation on Thr45; ab68187), and 4E-BP1 (ab2606) were from Abcam (Cambridge, UK). ATF6 clone 70B1413.1 were from Abcam (Cambridge, UK; ab11909) and Novus Biological (Littleton, CO; NBP1-40256). Antibodies against CHOP (SC-575), ATF4 (SC-200), GADD34 (SC-8327) and XBP1 (SC-7160) came from SantaCruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) and BiP (610978) from BD Laboratories™ (Franklin Lakes, NJ). Antibody against α-tubulin was from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Protein extraction and Western blot analysis

After glucose withdrawal, hypoxia or drug treatments for the given times, cells were washed 2 times with cold PBS and lysed in cold solubilization buffer (pH 8) containing 150 mM NaCl, 50 mM Tris-base, 2 mM EDTA, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 1% NP40, 2 mM orthovanadate, and 20 mM NaF. Cell lysates were centrifuged at 13,000 rpm for 20 min at 4°C and the supernatant was stored at –80°C. Protein yield was quantified using the Bradford protein assay kit. The absorbance was read after 10 min of incubation at 595 nm. Total protein lysates (20 µg) were then separated by electrophoresis on a 10% SDS-PAGE gel and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) (Millipore, Billerica, MA). Saturation was achieved in a 0.1% Tween 20 Tris-buffered saline solution containing 5% non-fat dry milk for 1 h. Membranes were hybridized with primary antibodies overnight at 4°C, washed and incubated with the corresponding immunoperoxidase-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories; Beckman Coulter France, Roissy, France) for 1 h at room temperature. Immunodetection was performed using electrochemiluminescence (ECL Western Blotting Detection System; Covalab, Villeurbanne, France or Luminata Crescendo, Millipore, Billerica, MA) and acquired with Chemi-Doc XR5 machine (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Quantity One software were used. To avoid cross-detection between phosphorylated and total forms of the protein, membranes were stripped.

RNA extraction and XBP1 splicing assessment

Total RNA was isolated from cells with the Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Complementary DNA was synthesized with Superscript II (Invitrogen, Carslbad, CA) with oligo(dT) primers (Invitrogen, Carslbad, CA). The active form of XBP1 is its spliced form. The unspliced form of XBP1 possesses a Pst1 restriction site, which is not present on the spliced form. The level of spliced XBP1 was assessed by amplifying its cDNA using a primer pair encompassing the missing sequences in XBP1s (5′-GAACCAGGAGTTAAGAACACG-3′ and 5′-AGGCAACAGTGTCAGAGTCC-3′) and performing a subsequent enzymatic digestion targeting the Pst-1 site. The digest was then run on a 2.5% agarose gel. The inactive/spliced form resulted in two small fragments, following digestion with Pst1 (New England Biolabs, Ipswich, MA), while the active/spliced form remained undigested. A fourth band was also obtained and corresponded to a hybrid (h) between the unspliced and spliced ssDNA formed during the PCR.

Immunofluorescence staining

After glucose depletion or drug treatments for the given times, cells were fixed with paraformaldehyde 4%, washed 3 times with cold phosphate buffered saline (PBS) and permeabilized using PBS 0.1% Triton. Unspecific sites were blocked with 4% bovine serum albumin (BSA)

diluted in PBS containing 0.1% Triton. Primary antibody was then added overnight at 4°C, in PBS 0.1% Triton containing 2% BSA. Cells were washed 3 times with PBS and incubated with the corresponding fluorescein-conjugated secondary antibody for 1h, diluted in PBS 0.1% Triton, 2% BSA. The nucleus dye Hoechst was added for 5 min, then cells were washed 3 times. Slides were observed using confocal microscope Zeiss780 and analyzed with ZEN microscope and imaging software. Nuclear signal quantification was performed using ImageJ software. All experiments were performed at least 3 times.

siRNA transfection

siRNA oligonucleotides duplexes targeting mouse ATF6 (ON-TARGETplus SMARTpool siRNA ATF6) ON-TARGETplus or non-targeting siRNAs were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO). siRNA were resuspended in 1× siRNA buffer (Dharmacon). After 48 h of incubation in normal growth condition, cells were transfected with the siRNA (30 nM) using Interferin reagent purchased from Polyplus (Illkirch, France) in Optimem medium. After 24 h of incubation with the siRNA, media was aspirated gently and replaced with normal growth culture medium containing no siRNA. After 24 h and 48 h, transfection were stopped by washing cells 2 times with ice cold PBS. Subcellular fractionation was directly performed.

Subcellular fractionation

Cells were washed with PBS, harvested by trypsin-EDTA and washed twice with PBS to remove traces of trypsin and growth medium. Pellets were lysed in buffer A containing 10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT and phosphatases inhibitors NaF, Na_3VO_4 and beta-glycerophosphate, and proteases inhibitors, during 5 minutes on ice. Thereafter, NP-40 was added at a final concentration of 0.5% (v/v) for 10 minutes on ice. Supernatants were collected by centrifugation (3000 rpm 10 minutes at 4°C) and represent the cytoplasmic fraction. Supernatants were stored at −80°C. Nuclear pellets were washed 2 times using Buffer A as described above with NP-40 0.5%. Nuclear pellets were lysed in RIPA buffer containing 50 mM TRIS-HCl pH 8, 150 mM NaCl, NP-40 1%, deoxycholate sodium 0.5%, SDS 0.1%, phosphatases and proteases inhibitors. After vigorous vortexing, nuclear pellets were incubated 30 minutes on ice, then centrifuged at 3000 rpm for 30 minutes at 4°C. The supernatants, representing nuclear fraction, were collected and stored at −80°C.

Statistical analysis

Results are presented as mean ± S.E.M. Significant differences were analyzed using Sigma Plot, Mann-Whitney test, *t*-tests or Holm-Sidak ANOVA test were performed. $P < 0.05$ (*) or $P < 0.001$ (***) were required for statistical significance, respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Annabelle Bouchardon from the CIQLE platform for her help to confocal microscopy and Christophe Vanbelle and Denis Ressnikoff for their expertise in confocal analysis. We are also very grateful to Dr Cedric Chaveroux who read the paper and brought a lot of substantial comments.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to declare.

FUNDING

This work was funded by grants from ARC, GTE and La Ligue Saone et Loire to CFP, a postdoctoral fellowship from Lyric to CV.

REFERENCES

1. Ma Y, Hendershot LM. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? Nat Rev Cancer. 2004; 4:966–77.
2. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. Nat Cell Biol. 2011; 13:184–90.
3. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007; 8:519–29.
4. Hartley T, Siva M, Lai E, Teodoro T, Zhang L, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress response in an INS-1 pancreatic β-cell line with inducible expression of a folding-deficient proinsulin. BMC Cell Biol. 2010; 11:59.
5. Teodoro T, Odisho T, Sidorova E, Volchuk A. Pancreatic β-cells depend on basal expression of active ATF6α-p50 for cell survival even under nonstress conditions. American Journal of Physiology - Cell Physiology. 2012; 302:C992–1003.
6. Odisho T, Zhang L, Volchuk A. ATF6β regulates the Wfs1 gene and has a cell survival role in the ER stress response in pancreatic β-cells. Experimental Cell Research. 2015; 330:111–22.
7. Larsson DE, Wickström M, Hassan S, Öberg K, Granberg D. The Cytotoxic Agents NSC-95397, Brefeldin A, Bortezomib and Sanguinarine Induce Apoptosis in Neuroendocrine Tumors *In Vitro*. Anticancer Res. 2010; 30:149–56.
8. Rosengren V, Johansson H, Lehtiö J, Fransson L, Sjöholm Å, Ortsäter H. Thapsigargin down-regulates protein levels of GRP78/BiP in INS-1E cells. J Cell Biochem. 2012; 113:1635–44.

9. Kato H, Nakajima S, Saito Y, Takahashi S, Katoh R, Kitamura M. mTORC1 serves ER stress-triggered apoptosis via selective activation of the IRE1-JNK pathway. Cell Death Differ. 2012; 19:310–20.
10. Ozcan U, Ozcan L, Yilmaz E, Duvel K, Sahin M, Manning BD, Hotamisligil GS. Loss of the Tuberous Sclerosis Complex Tumor Suppressors Triggers the Unfolded Protein Response to Regulate Insulin Signaling and Apoptosis. Mol Cell. 2008; 29:541–51.
11. Tenkerian C, Krishnamoorthy J, Mounir Z, Kazimierczak U, Khoutorsky A, Staschke KA, Kristof AS, Wang S, Hatzoglou M, Koromilas AE. mTORC2 Balances AKT Activation and eIF2α Serine 51 Phosphorylation to Promote Survival under Stress. Mol Cancer Res. 2015; 13:1377–88.
12. Misra UK, Pizzo SV. Receptor-Recognized ?2-Macroglobulin Binds to Cell Surface-Associated GRP78 and Activates mTORC1 and mTORC2 Signaling in Prostate Cancer Cells. PLoS One [Internet]. 2012 Dec 14 [cited 2014 Sep 18];7(12). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3522726/
13. Su H-Y, Waldron RT, Gong R, Ramanujan VK, Pandol SJ, Lugea A. The Unfolded Protein Response Plays a Predominant Homeostatic Role in Response to Mitochondrial Stress in Pancreatic Stellate Cells. PLOS ONE. 2016; 11:e0148999.
14. Tyagi R, Shahani N, Gorgen L, Ferretti M, Pryor W, Chen PY, Swarnkar S, Worley PF, Karbstein K, Snyder SH, Subramaniam S. Rheb Inhibits Protein Synthesis by Activating the PERK-eIF2α Signaling Cascade. Cell Rep. 2015.
15. Jiang M, Liu L, He X, Wang H, Lin W, Wang H, Yoon SO, Wood TL, Lu QR. Regulation of PERK–eIF2α signalling by tuberous sclerosis complex-1 controls homoeostasis and survival of myelinating oligodendrocytes. Nature Communications. 2016; 7:12185.
16. Bobrovnikova-Marjon E, Pytel D, Riese MJ, Vaites LP, Singh N, Koretzky GA, Witze ES, Diehl JA. PERK Utilizes Intrinsic Lipid Kinase Activity To Generate Phosphatidic Acid, Mediate Akt Activation, and Promote Adipocyte Differentiation. Mol Cell Biol. 2012; 32:2268–78.
17. Avivar-Valderas A, Bobrovnikova-Marjon E, Diehl JA, Bardeesy N, Debnath J, Aguirre-Ghiso J. Regulation of autophagy during ECM detachment is linked to a selective inhibition of mTORC1 by PERK. Oncogene. 2013; 32:4932–40.
18. Kang YJ, Lu M-K, Guan K-L. The TSC1 and TSC2 tumor suppressors are required for proper ER stress response and protect cells from ER stress-induced apoptosis. Cell Death Differ. 2011; 18:133–44.
19. Appenzeller-Herzog C, Hall MN. Bidirectional crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling. Trends in Cell Biology. 2012; 22:274–82.
20. Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, Schulick RD, Tang LH, Wolfgang CL, Choti MA, Velculescu VE, Diaz LA Jr, Volgestein B et al. DAXX/ATRX, MEN1 and mTOR Pathway Genes are Frequently Altered in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. Science. 2011; 331:1199–203.
21. Banck MS, Kanwar R, Kulkarni AA, Boora GK, Metge F, Kipp BR, Zhang L, Thorland EC, Minn KT, Tentu R, Eckloff BW, Wieben ED, Wu Y, et al. The genomic landscape of small intestine neuroendocrine tumors. J Clin Invest. 2013; 123:2502–8.
22. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevilla J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, et al. Everolimus for Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors. N Engl J Med. 2011; 364:514–23.
23. Everolimus Plus Best Supportive Care vs Placebo Plus Best Supportive Care in the Treatment of Patients With Advanced Neuroendocrine Tumors (GI or Lung Origin) - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2015 Dec 17]. Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01524783.
24. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. Dev Cell. 2007; 13:365–76.
25. Di Nardo A, Kramvis I, Cho N, Sadowski A, Meikle L, Kwiatkowski DJ, Sahin M. Tuberous Sclerosis Complex Activity is Required to Control Neuronal Stress Responses in an mTOR-Dependent Manner. J Neurosci. 2009; 29:5926–37.
26. Inoki K, Mori H, Wang J, Suzuki T, Hong S, Yoshida S, Blattber SM, Ikenoue T, Rüegg MA, Hall MN, Kwiatkowski DJ, Rastaldi MP, Huber TB, et al. mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. J Clin Invest. 2011; 121:2181–96.
27. Bachar E, Ariav Y, Ketzinel-Gilad M, Cerasi E, Kaiser N, Leibowitz G. Glucose Amplifies Fatty Acid-Induced Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic β-Cells via Activation of mTORC1. PLoS ONE [Internet]. 2009 Mar 23 [cited 2015 Feb 23];4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2654723/.
28. Maas NL, Diehl JA. Molecular Pathways: The PERKs and Pitfalls of Targeting the Unfolded Protein Response in Cancer. Clin Cancer Res. 2014; clincanres.3239.2014.
29. Bollard J, Couderc C, Blanc M, Poncet G, Lepinasse F, Hervieu V, Gouysse G, Ferraro-Peyret C, Benslama N, Walter T, Scoazec JY, Roche C. Antitumor effect of everolimus in preclinical models of high-grade gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinomas. Neuroendocrinology. 2013; 97:331–40.
30. Feng D, Wei J, Gupta S, McGrath BC, Cavener DR. Acute ablation of PERK results in ER dysfunctions followed by

reduced insulin secretion and cell proliferation. BMC Cell Biol. 2009; 10:61.

31. Hassler JR, Scheuner DL, Wang S, Han J, Kodali VK, Li P, Nguyen J, George JS, Davis C, Xu SP, Bai Y, Sartor M, Cavalcoli J, et al. The IRE1α/XBP1s Pathway Is Essential for the Glucose Response and Protection of β Cells. PLoS Biol. 2015; 13:e1002277.

32. Qiu Y, Mao T, Zhang Y, Shao M, You J, Ding Q, Chen Y, Wu D, Xie D, Lin X, Gao X, Kaufman RJ, Wenjun L, et al. A crucial role for RACK1 in the regulation of glucose-stimulated IRE1alpha activation in pancreatic beta cells. Sci Signal. 2010; 3:ra7.

33. Chan JY, Luzuriaga J, Maxwell EL, West PK, Bensellam M, Laybutt DR. The balance between adaptive and apoptotic unfolded protein responses regulates β-cell death under ER stress conditions through XBP1, CHOP and JNK. Mol Cell Endocrinol. 2015; 413:189–201.

34. Scoazec J-Y. [Endocrine tumors: biology and physiopathology]. Ann Pathol. 2005; 25:447–61.

35. Rindi G, Grant SG, Yiangou Y, Ghatei MA, Bloom SR, Bautch VL, Solcia E, Polak JM. Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. Heterogeneity of hormone expression. Am J Pathol. 1990; 136:1349–63.

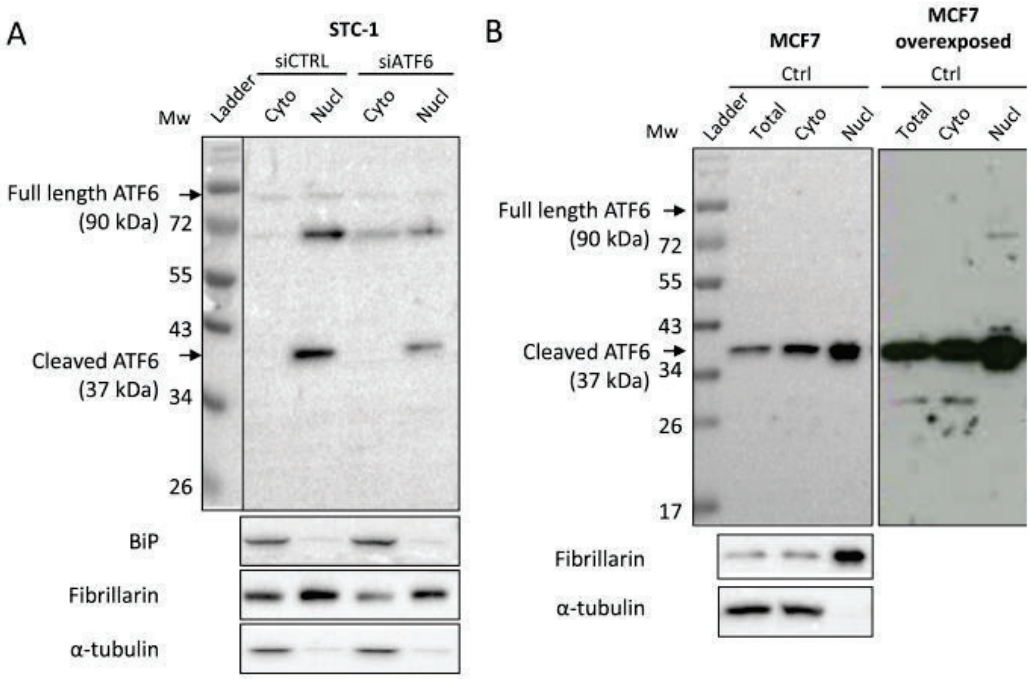
36. Drucker DJ, Jin T, Asa SL, Young TA, Brubaker PL. Activation of proglucagon gene transcription by protein kinase-A in a novel mouse enteroendocrine cell line. Mol Endocrinol. 1994; 8:1646–55.

37. Rajesh K, Krishnamoorthy J, Kazimierczak U, Tenkerian C, Papadakis AI, Wang S, Huang S, Koromilas AE. Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2α at serine 51 determines the cell fate decisions of Akt in response to oxidative stress. Cell Death Dis. 2015; 6:e1591.

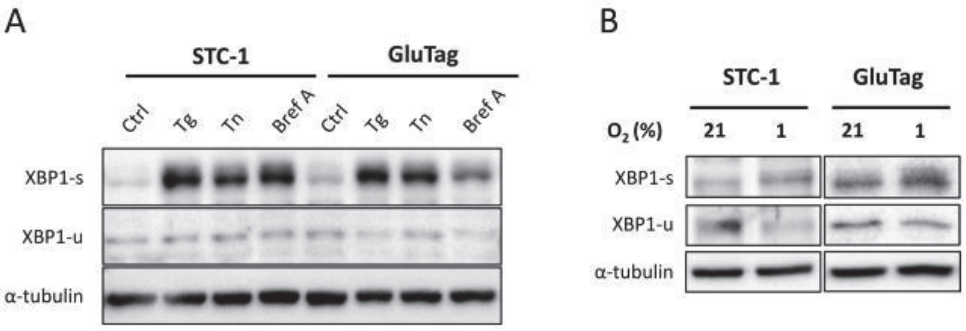
38. Shah MH, Young D, Kindler HL, Webb I, Kleiber B, Wright J, Grever M. Phase II study of the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341) in patients with metastatic neuroendocrine tumors. Clin Cancer Res. 2004; 10:6111–8.

mTOR inhibitors activate PERK signaling and favor viability of gastrointestinal neuroendocrine cell lines

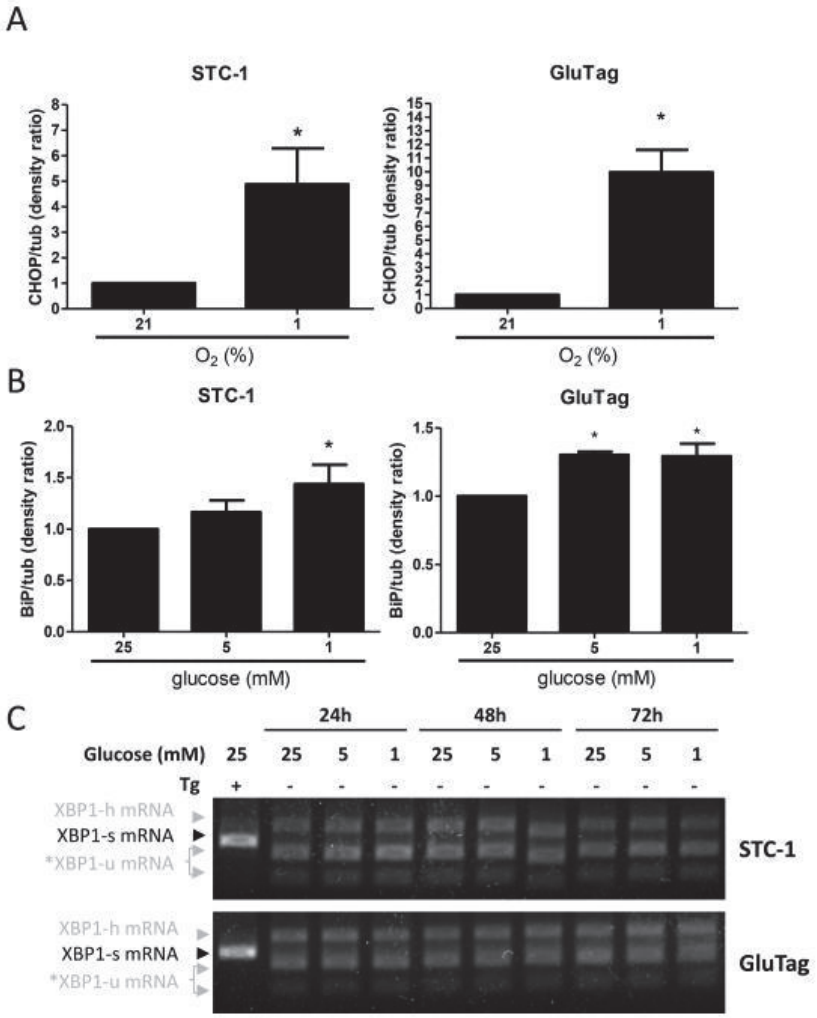
Supplementary Materials



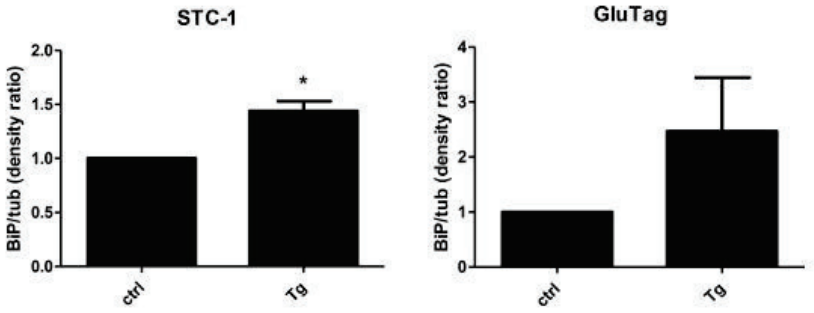
Supplementary Figure 1: ATF6 localization in STC-1 and MCF7 cells. (**A**) STC-1 cells were transfected using siRNA oligonucleotides duplexes targeting mouse ATF6 siRNA ATF6 or siCTRL (30 nM). After 48 h subcellular fractionation was performed. ATF6 protein expression in cytoplasmic and nuclear fractions were studied by western blot analysis. BiP was used as endoplasmic reticulum internal control, fibrillarin was used as nucleic internal control and α-tubulin was used as total and cytoplasmic internal control. (**B**) ATF6 protein expression in total, cytoplasmic and nuclear cell lysates of MCF7 cell line. Subcellular fractionation was performed as described above. Fibrillarin was used as nucleic internal control and α-tubulin was used as total and cytoplasmic internal control. Results are representative of 3 experiments.



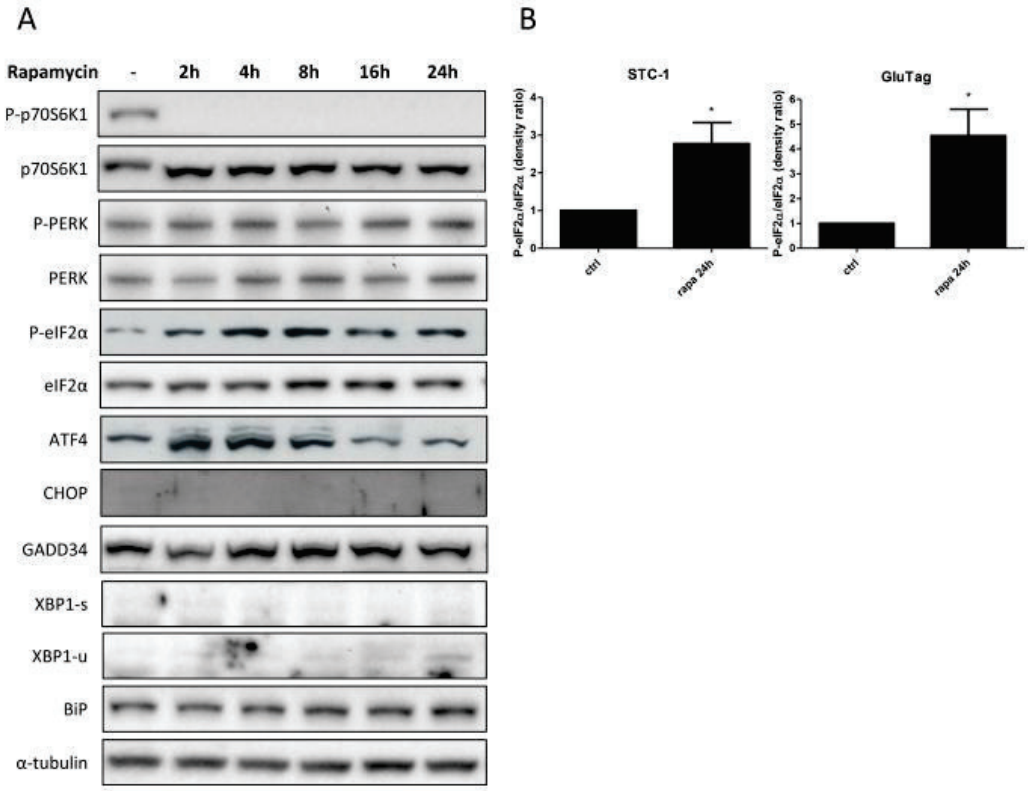
Supplementary Figure 2: Effect of UPR inducers and hypoxia on the expression of XBP1-spliced and unspliced proteins. (**A**) STC-1 and GluTag cells were incubated in medium (Ctrl) or ER stress-inducing agents thapsigargin (Tg, 300 nM), tunicamycin (Tn, 0.05 µg/mL) and brefeldin A (Bref A, 3 µM) for 4 h, 16 h and 8 h respectively. (**B**) STC-1 and GluTag cells were subjected to hypoxia for 24 h. (B) Protein expression level of XBP1 spliced or unspliced was examined using Western Blot analysis. α-tubulin was used as internal control. Results are representative of at least 3 experiments.



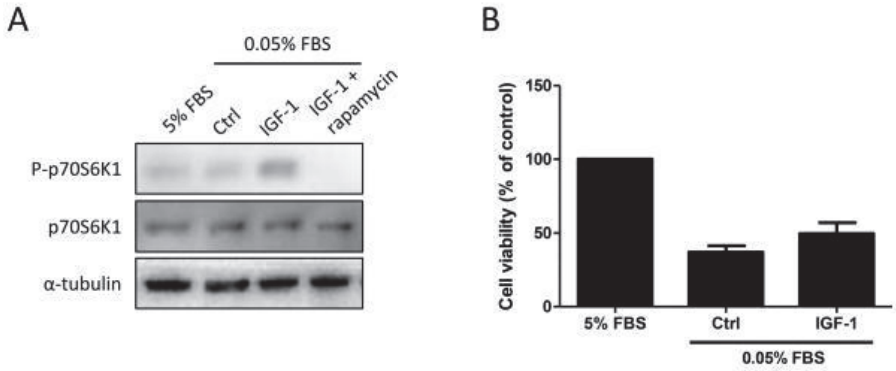
Supplementary Figure 3: Activation of the UPR during hypoxia or glucose depletion in STC-1 and GluTag cell lines. (**A**) Densitometric quantitation of CHOP/α-tubulin ratios analysis in STC-1 or GluTag cell lines submitted for 24 h to normoxia or hypoxia. Data are presented as mean ± SEM of an experimental $n = 3$ (*$P < 0.05$ versus control). (**B**) Densitometric quantitation of BiP/α-tubulin ratios analysis in STC-1 or GluTag cell lines cultured in various concentration of glucose for 24 h. Data are presented as mean ± SEM of an experimental $n = 3$ (*$P < 0.05$ versus control). (**C**) STC-1 or GluTag cells were cultivated with decreasing concentration of glucose i.e. 25, 5 or 1 mM, for 24 h, 48 h and 72 h. XBP1 mRNA splicing was analyzed by RT-PCR after Pst1 digestion: XBP1-u, unspliced; XBP1-h, hybrid; XBP1-s, spliced variant of XBP1; *, XBP1-u mRNA fragments after Pst1 digestion. Tg-treated cells were used as positive control. Results are representative of at least 3 experiments.



Supplementary Figure 4: Thapsigargin treatment effect on BiP expression. Densitometric quantification of BiP/α-tubulin ratios analysis in STC-1 or GluTag cell lines treated or not with Tg for 4 h Data are presented as mean ± SEM of an experimental $n = 3$ ($^*P < 0.05$ versus control).



Supplementary Figure 5: Effect of rapamycin on markers of the UPR pathways. (**A**) STC-1 cells were incubated with 10 nM rapamycin for 2 h to 24 h. Total protein extracts were subjected to Western Blot analysis. Protein expression levels were assessed for phosphorylated or total forms of p70S6K1, 4E-BP1, PERK, eIF2α and for ATF4, CHOP, GADD34, BiP, XBP1-s and XBP1-u proteins. α-tubulin was used as internal control. Results are representative of at least 3 experiments. (**B**) Densitometric quantification of P-eIF2α/eIF2α ratio in STC-1 or GluTag cell lines treated or not with rapamycin for 24 h. Data are presented as mean ± SEM of an experimental $n = 3$ ($^*P < 0.05$ versus control).



Supplementary Figure 6: Effect of serum deprivation and IGF1 activation on p70S6K1 activation and cell viability. STC-1 cells were submitted to serum deprivation (0.05% FBS) overnight before treating cells with 3 nM IGF-1 or with both 3 nM IGF-1 and 10nM rapamycin (IGF-1 + rapamycin). Usual culture medium was used as control (5% FBS). (**A**) Total protein extracts were subjected to Western Blot analysis. Protein expression levels were assessed for phosphorylated or total forms of p70S6K1. α-tubulin was used as internal control. Results are representative of at least 3 experiments. (**B**) Cell viability was assessed using MTT test over the last 2 hours of treament. The graph shows the mean of at least 3 independent experiments ± SEM

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Nos résultats de l'article « mTOR inhibitors activate PERK signaling and favor viability of gastrointestinal neuroendocrine cell lines » montrent que les cellules de NNE GI activent l'UPR en réponse à différents types de stress (pharmacologique ou métabolique). Le profil d'activation de l'UPR varie en fonction de l'intensité et du type de stress provoqués. Nous avons également démontré que des molécules inductrices de l'UPR (thapsigargine, tunicamycine et brefeldine A) activent l'UPR de façon intense, provoquant l'apoptose des cellules STC-1 et GluTag, mise en évidence par le clivage de la caspase 3. Nous démontrons que des facteurs de stress comme la déplétion en glucose, l'hypoxie ou le traitement par la thapsigargine activent la voie mTORC1. De façon surprenante, nous avons également démontré que l'inhibition de la voie mTOR provoquait l'activation de la voie PERK d'une part, et que cette activation augmentait la viabilité des cellules de NNE GI d'autre part. La voie PERK semble donc avoir un rôle pro-survie dans les NNE GI.

Ces résultats suggèrent que l'UPR joue un rôle dans le développement des NNE GI et posent différentes questions :

- L'UPR peut-il constituer une nouvelle cible thérapeutique dans la lutte contre les NNE GI ?
- L'UPR contrôle-t-il la voie mTORC1 dans les cellules de NNE GI ?
- Quel est le rôle de la voie PERK dans le développement tumoral et peut-on le cibler en particulier ?

Je vais à présent vous présenter les résultats que j'ai obtenus au cours de mon doctorat pour répondre à ces questions.

1. L'UPR PEUT-IL ETRE UNE NOUVELLE CIBLE THERAPEUTIQUE DANS LA LUTTE CONTRE LES NNE GI ?

1.1. Les modulateurs de l'UPR ont-ils un impact sur la viabilité de cellules de NNE GI ?

D'après nos précédentes expériences menées dans les cellules de NNE GI STC-1 et GluTag, la réponse UPR est activable lorsqu'elles sont traitées avec des inducteurs de l'UPR, tels que la thapsigargine, la tunicamycine ou la brefeldine A.

Nous nous sommes demandé quels étaient les effets d'inducteurs, mais aussi d'inhibiteurs de l'UPR, sur la prolifération des cellules STC-1 *in vitro.* Nous avons sélectionné cinq molécules activatrices ou inhibitrices de l'UPR qui sont en cours d'essais précliniques ou cliniques. Le GSK2656157 est un inhibiteur de la phosphorylation de PERK. L'arctigénine est décrite pour inhiber l'UPR et la transcription de BiP, le salubrinal, un inhibiteur de la déphopshorylation d'eIF2α, entraine le maintien de l'activation de cette voie. Le bortezomib, inhibiteur du protéasome, est actuellement utilisé pour le traitement du myélome multiple ou du lymphome à cellules du manteau et enfin le 4-PBA inhibe le SRE grâce à son action de protéine chaperon de synthèse.

Nous avons dans un premier temps étudié l'effet de ces molécules sur la réponse UPR des cellules STC-1 (Figure 12). L'activation de la voie PERK est observée grâce à la phosphorylation de PERK et d'eIF2, et à l'augmentation de l'expression d'ATF4 et de CHOP. L'induction d'IRE1 est observée soit par le splicing de XBP1, soit par l'augmentation d'expression de $P58^{IPK}$. Enfin, l'activation d'ATF6 est observée par l'augmentation d'expression de BiP. Afin d'observer l'effet des molécules décrites pour inhiber l'UPR, soit le GSK2656157, l'arctigénine, le salubrinal et le 4-PBA, nous avons induit un SRE soit par l'ajout de thapsigargine, soit par la déplétion en glucose, en exposant les cellules à 1 mM de glucose. Nous avons observé les effets du bortezomib dans les conditions de culture habituelles (25 mM glucose), car il induit le SRE de lui-même, par accumulation des protéines normalement éliminées par le protéasome dans la lumière du RE.

Dans un second temps, nous avons évalué l'effet de ces molécules sur la viabilité des cellules STC-1 (Figure 13, 14 et 15). Ces résultats sont résumés dans le tableau 7.

Lorsque le SRE est déclenché par la thapsigargine ou par la déplétion en glucose, le **GSK2656157** inhibe bien la voie PERK, avec une diminution des phosphorylations de PERK et eIF2α,

ainsi qu'une diminution légère de l'expression d'ATF4 (Figure 12A). Comme présenté dans l'article, la thapsigargine induit fortement l'expression de la protéine CHOP ainsi que le clivage de la caspase 3. L'expression de ces protéines, en présence de GSK2656157 semble légèrement induite. Au contraire, un SRE activé par la déplétion en glucose n'entraine pas l'expression de CHOP ni de caspase 3 clivée et l'ajout de GSK2656157 ne modifie pas cet état. L'expression de BiP n'est pas modifiée en présence de GSK2656157, ni celle de $P58^{IPK}$, qui est exprimé lorsque la voie IRE1/XBP1 est activée. Ces résultats suggèrent la spécificité d'action de GSK2656157 sur la voie PERK en présence d'un SRE, et montre une légère augmentation du clivage de la caspase 3 lors de l'association GSK2656157 et thapsigargine. Ce résultat est confirmé par la baisse légère, mais significative (9%, p<0,05) de viabilité quand les cellules sont en présence de GSK2656157 et de thapsigargine (Figure 13C).

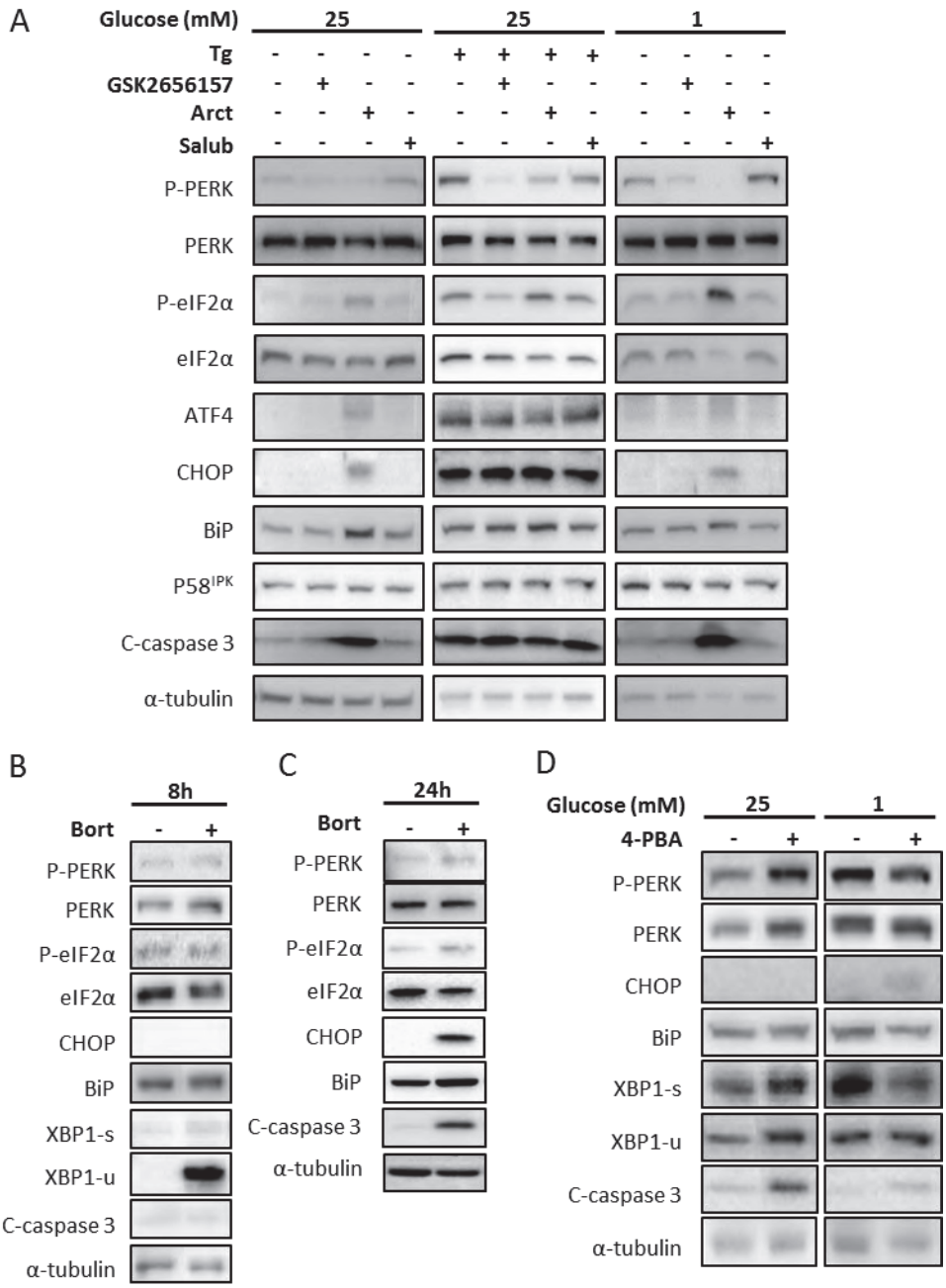


Figure 12 : Evaluation de l'état des voies de l'UPR lors de traitements avec différents modulateurs de l'UPR dans les cellules STC-1.

A : Les cellules STC-1 sont cultivées pendant 48h dans le milieu de référence à 25 mM de glucose. Elles sont traitées pendant 24h avec le GSK2656157 à 100 nM ou l'arctigénine (Arct) à 10 µM ou le salubrinal (Salub) à 860 nM. 8h avant l'arrêt de l'expérience, les cellules sont traitées par la thapsigargine (Tg, 300 nM), ou le changement de milieu à 1 mM de glucose est effectué. Les protéines sont ensuite extraites et l'expression des protéines de l'UPR est évaluée par western-blot. L'α-tubuline sert de contrôle interne.
B-C : Après 48h de culture, les cellules STC-1 sont traitées par le bortezomib à 30 nM pendant 8h (B) et 24h (C). L'expression des protéines de l'UPR est analysée par western-blot. Les protéines ont été chargées sur le même gel d'électrophorèse, puis les images ont été coupées et reconstituées pour faciliter l'analyse.
D : Les cellules STC-1 sont cultivées dans le milieu de référence contenant soit 25 mM glucose, soit 1 mM de glucose pendant 3 jours puis les cellules sont traitées par le 4-PBA à 100 µM pendant 24h. L'expression des protéines de l'UPR est analysée par western-blot. Les protéines ont été chargées sur le même gel d'électrophorèse, puis les images ont été coupées et reconstituées pour faciliter l'analyse.
Les expériences ont été conduites 3 fois.

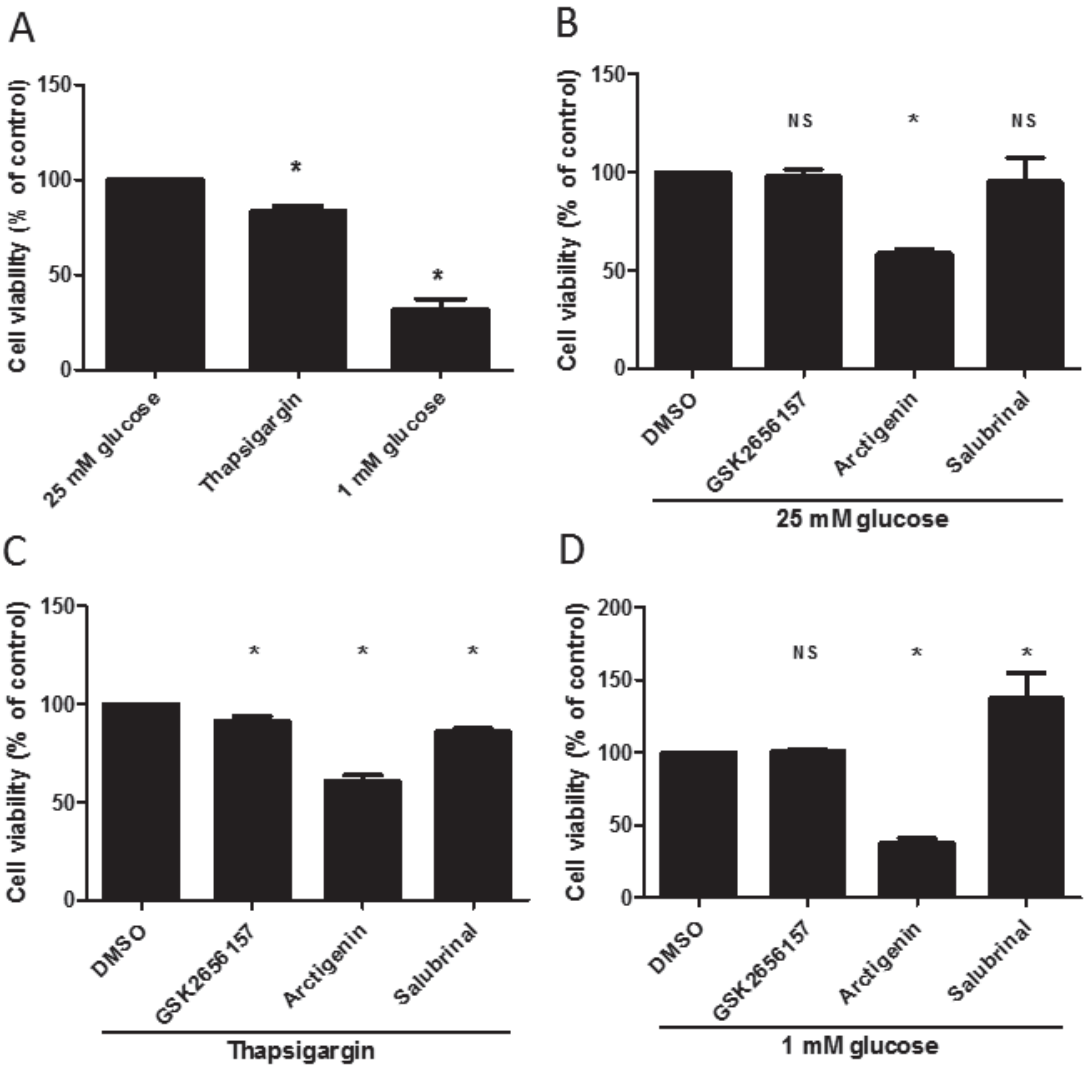


Figure 13 : Impact des traitements GSK2656157, arctigénine et salubrinal sur la viabilité des cellules STC-1, soumises ou non à différentes conditions de SRE.

A : Viabilité cellulaire évaluée par test MTT des cellules traitées avec la thapsigargine ou cultivées en présence d'1 mM glucose pendant 8h.
B : Les cellules sont traitées avec le GSK2656157, l'artcigénine ou le salubrinal pendant 24h puis la viabilité cellulaire est évaluée grâce au test MTT.
C, D : Les cellules sont traitées pendant 24h avec le GSK2656157 à 100 nM ou l'arctigénine à 10 µM ou le salubrinal à 860 nM. 8h avant l'arrêt de l'expérience, les cellules sont traitées par la thapsigargine (300 nM) (C), ou le changement de milieu à 1 mM de glucose est effectué (D). Après 24h d'incubation, la viabilité cellulaire est évaluée grâce au test MTT.
Note : *, $p<0,05$; NS, non significatif. Les graphiques représentent la moyenne de 3 expériences (moyenne ± SEM).

La molécule **arctigénine** est un inhibiteur de SRE, permettant l'inhibition de l'expression de P-PERK, ATF4, CHOP et BiP lors d'une déplétion en glucose. En parallèle, elle augmente l'expression de P-eIF2α et entraine le clivage des caspases 9 et 3 dans les cellules HT-29 de cancer du côlon (J.-Y. Kim et al. 2010). Dans les cellules STC-1 soumises au traitement par thapsigargine (Figure 12A), l'arctigénine diminue l'expression de P-PERK et d'ATF4. Elle augmentte l'expression de BiP et ne modifie pas celle de $P58^{IPK}$. L'expression de CHOP et de la caspase 3 clivée étant très forte dans la condition thapsigargine seule, l'effet de l'ajout d'arctigénine est difficilement interprétable. En condition de déplétion en glucose, une inhibition totale de l'expression de P-PERK est observée alors qu'elle augmente fortement l'expression de P-eIF2α. Les expressions d'ATF4, CHOP et BiP sont induites par l'arctigénine, contrairement à ce qui a été décrit dans les cellules HT-29. Elle ne modifie pas l'expression de $P58^{IPK}$ et elle induit fortement l'apoptose (clivage de la caspase 3). Ce profil d'activation de l'UPR est similaire à celui observé en l'absence de SRE, à 25 mM de glucose. En condition de culture normale et lors d'un traitement avec la thapsigargine, l'arctigénine diminue d'environ 40% la viabilité cellulaire (p<0,05) (Figure 13B et C). En condition de SRE induit par la déplétion en glucose, la diminution de viabilité est plus importante (63%, p<0,05) (Figure 13D).

Le **salubrinal** diminue la phosphorylation de PERK lors du traitement avec la thapsigargine mais il l'augmente lors de la déplétion en glucose (Figure 12A). Il ne modifie pas la phosphorylation d'eIF2α et l'expression d'ATF4 en présence de thapsigargine et lors de la déplétion en glucose. Le salubrinal ne modifie pas les expressions de BiP et de $P58^{IPK}$ lors du traitement thapsigargine, et les diminue lors de la déplétion en glucose. L'effet du salubrinal sur la viabilité cellulaire est également diférent selon le SRE appliqué. La viabilité est diminuée de 14% avec le traitement thapsigargine (p<0,05) alors que l'ajout de salubrinal est protecteur lors d'une déplétion en glucose, avec un gain de viabilité de 37% (p<0,05).

Le **bortezomib** n'induit pas la voie PERK après 8h de traitement, car les états de phosphorylation de PERK et eIF2α ne sont pas augmentés (Figure 12B). Il n'induit pas l'expression de CHOP ni de caspase 3 clivée. L'expression de BiP est au contraire induite par le traitement. XBP1-s est très légèrement induit, et l'expression de XBP1-u est fortement augmentée suite au traitement. On peut supposer que le traitement par bortezomib entraine une accumulation de XBP1-u car il ne peut plus être éliminé par la voie du protéasome (H. Yoshida et al. 2001). Après 24h de traitement, la voie PERK est au contraire activée. Le traitement induit l'expression de BiP ainsi que le clivage de la caspase 3 (Figure 12C). On peut donc en conclure que les voies PERK et ATF6 sont activées par cette molécule, après 24h de traitement. L'effet de cette molécule sur la viabilité cellulaire a été

évalué après 24h de traitement. On observe une baisse de la viabilité cellulaire de 22% (p<0,05) (Figure 14).

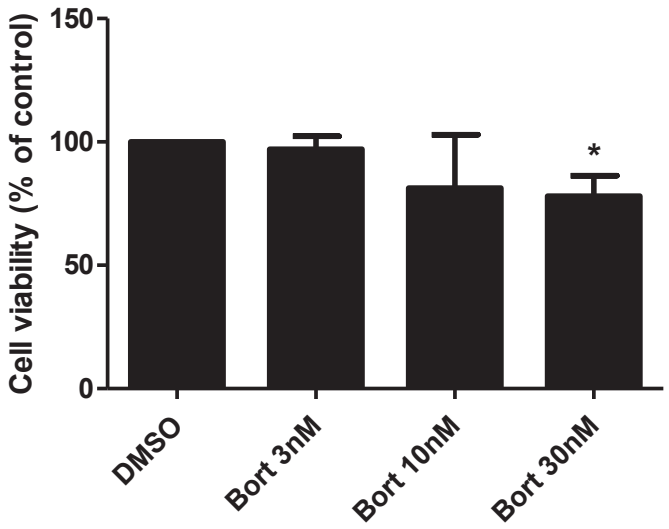


Figure 15 : Impact du traitement bortezomib sur la viabilité des cellules STC-1.

Les cellules STC-1 sont cultivées pendant 48h en condition de culture normale puis traitées par différents concentrations de bortezomib (3, 10 ou 30 nM) pendant 24h. La viabilité cellulaire est évaluée grâce au test MTT. Note : *, p<0,05. Le graphique représente la moyenne de 3 expériences (moyenne ± SEM).

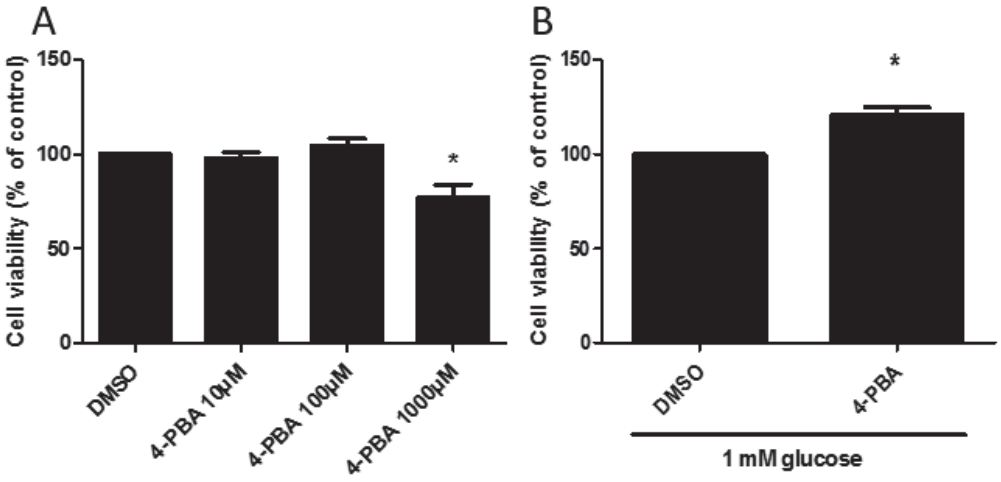


Figure 14 : Impact du traitement 4-PBA sur la viabilité des cellules STC-1, soumises ou non à un SRE.

A : Les cellules STC-1 sont cultivées pendant 48h puis traitées par le 4-PBA à 10, 100 ou 1000 µM pendant 24h. La viabilité cellulaire est évaluée grâce au test MTT.
B : Les cellules STC-1 sont cultivées pendant 3 jours à 1 mM glucose, puis le traitement 4-PBA est ajouté au milieu pendant 24h. La viabilité cellulaire est ensuite évaluée par le test MTT. Note : *, p<0,05. Les graphiques représentent la moyenne de 3 expériences (moyenne ± SEM).

L'impact du **4-PBA** sur les voies de l'UPR a été évalué dans les conditions de culture habituelle (25 mM de glucose) et dans des conditions de déplétion en glucose (1 mM de glucose) (Figure 12D). En présence de 25 mM glucose, l'effet du 4-PBA est contraire à ce qui est décrit dans la littérature : PERK est phosphorylé, la voie IRE1 est activée (splicing de XBP1) et l'expression de BiP est augmentée. Cependant, la voie PERK n'entraine pas l'expression de CHOP alors que la caspase 3 est clivée après 24h de traitement. Cependant, ce clivage n'est pas associé à la baisse de viabilité après 24 heures. Une baisse de viabilité de 23% est en revanche observée à une dose dix fois plus forte (1000 µM) (p<0,05 ; Figure 15A). Lorsque le SRE est activé par la déplétion en glucose, la molécule 4-PBA diminue le niveau de phosphorylation de PERK, ainsi que l'expression de BiP et XBP1-s, démontrant la diminution de l'activation de l'UPR. Il induit légèrement l'expression de CHOP et le clivage de la caspase 3, mais permet un gain de viabilité de 21% (p<0,05) (Figure 15B).

D'après ces premiers résultats *in vitro*, ces modulateurs de l'UPR pourraient présenter un intérêt anti-tumoral car on observe une induction d'apoptose, notamment lorsqu'un SRE est associé pour le GSK2656157 et l'arctigénine. Le bortezomib ne semble pas induire de réponse UPR complète après 8h de traitement. Néanmoins, cette molécule diminue la viabilité cellulaire après 24h de traitement. Au contraire, le salubrinal et le 4-PBA peuvent soit diminuer la viabilité soit l'augmenter en fonction du type de SRE induit.

Tableau 7 : Récapitulatif de l'effet des modulateurs de l'UPR sur les protéines de l'UPR et sur la viabilité cellulaire.

	P-PERK	P-eIF2α	ATF4	CHOP	Voie IRE1	BiP	Viabilité
GSK2656157	↘	↘	↘	≠[a]	=	=	↘[b]
Arctigénine	↘	↗	↗	↗	=	↗	↘
Salubrinal	≠[a]	=	=	=	≠[a]	≠[a]	≠[a]
Bortezomib	=	=	=	=	=	=	↘
4-PBA[c]	↘	NA	NA	↗	↘	↘	↗

Note : NA, non analysé ; [a], selon le type de SRE induit ; [b], en présence de Tg ; [c], en présence de SRE.

1.2. La modulation de la réponse UPR va-t-elle modifier le développement tumoral ?

Suite à ces résultats *in vitro*, nous avons étudié l'effet de ces modulateurs sur le développement tumoral *in vivo*. Peu de modèles de développement de NNE existent. Nous disposons au laboratoire d'un modèle murin mimant le développement d'un NNE GI et de ses métastases hépatiques.

1.2.1. Présentation du modèle

Afin d'évaluer l'impact de traitements modifiant la réponse UPR sur le développement métastatique de NNE GI, un modèle murin d'allogreffe est utilisé au laboratoire. Les cellules tumorales STC-1 sont injectées dans la rate de souris athymiques, permettant le développement d'une tumeur solide au niveau du site d'injection, puis la dissémination des cellules tumorales via le système porte. Des cellules migrent ensuite vers le foie où elles développent des nodules intrahépatiques, « mimant » les métastases hépatiques rencontrées chez le patient (Figure 16) (Pourreyron et al. 2008).

Ce modèle a été utilisé au laboratoire avec différentes lignées de tumeurs neuroendocrines, notamment les cellules STC-1 et GluTag, ainsi que les lignées pancréatiques INS 1E et INS R3, pour étudier l'effet anti-tumoral de l'inhibition de mTOR (Bollard et al. 2013; Couderc et al. 2011). Ce modèle reproduit le syndrome carcinoïde lors de son utilisation avec la lignée neuroendocrine pancréatique humaine BON, et reproduit également les atteintes cardiaques associées observées chez les patients (Musunuru et al. 2005).

Une semaine après l'injection intra-splénique des cellules STC-1, les traitements sont administrés pendant 14 jours (Tableau 8). Nous avons également traité les souris avec la molécule inhibitrice de mTOR RAD001, afin de comparer l'effet anti-tumoral des modulateurs du SRE à celui du RAD001 qui est bien décrit (Bollard et al. 2013). A la fin du traitement, les souris sont mises à mort, la rate et le foie sont prélevés et fixés dans du formol. Le foie est ensuite inclus en paraffine et nous évaluons la surface tumorale hépatique après coupe histologique colorée à l'HPS (hématoxyline-phloxine-safran) afin de différencier le tissu hépatique sain du tissu tumoral (Figure 17). Les données sont collectées à l'aide du logiciel HistoLab.

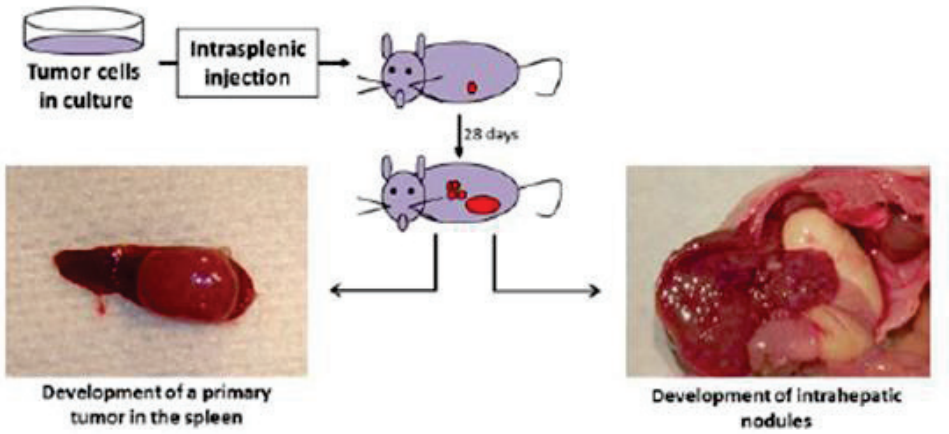


Figure 16 : Schéma du modèle de dissémination métastatique de TNE dans des souris athymiques.

Les cellules STC-1 sont cultivées et amplifiées dans les conditions normales de culture. Elles sont injectées dans la rate de souris athymiques de 6 semaines, où elles développent une tumeur solide primaire, et se disséminent jusqu'au foie par la veine porte, où elles développent des nodules intrahépatiques, mimant les métastases des patients. D'après C. Roche.

Tableau 8 : Modulateurs de l'UPR administrés aux souris, posologies et modes d'administration.

Molécule	Dose	Mode d'administration
GSK2656157	5 x 100 mg/kg/semaine	Per os
Salubrinal	5 x 1,5 mg/kg/semaine	Injection intra-péritonéale
Arctigénine	5 x 50 µg/kg/semaine	Injection intra-péritonéale
Bortezomib	2 x 1 mg/kg/semaine	Injection intra-péritonéale
4-PBA	5 x 250 mg/kg/semaine	Per os
RAD001	5 x 1,5 mg/kg/semaine	Injection intra-péritonéale

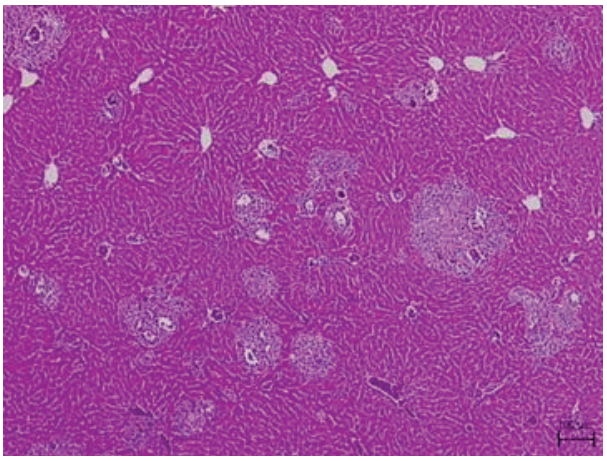


Figure 17 : Coupe histologique de foie de souris non traitée montrant les nodules intrahépatiques de cellules STC-1. Grossissement x400.

1.2.2. Résultats

Existe-t-il un SRE au sein des nodules intrahépatiques ?

Afin d'évaluer la pertinence d'administrer des modulateurs de la réponse UPR, nous souhaitions tout d'abord savoir si un SRE était décelable au sein des nodules intrahépatiques des souris allogreffées. Nous avons utilisé 2 marqueurs, GLUT1 et BiP. GLUT1 est un transporteur du glucose, surexprimé notamment lors d'une déprivation en glucose ou en présence d'hypoxie (Boado et Pardridge 1993; Stein et al. 1995). C'est un marqueur des zones hypoxiques tumorales dans un modèle murin de TNE pancréatique (RIP1Tag2) (Allen et al. 2016). La protéine chaperon BiP est communément utilisée pour signer la présence d'un SRE et de l'activation de l'UPR.

La figure 18 montre que le marqueur GLUT1 est exprimé dans les nodules, et que ce marquage est central, suggérant un appauvrissement en nutriments et en oxygène de manière plus importante au centre du nodule. La protéine BiP est aussi exprimée au sein des nodules, mais ce marquage est plus diffus et il ne colocalise pas avec le marquage GLUT1 (Figure 18). Ces résultats suggèrent que les cellules tumorales sont soumises à un SRE, suite à un appauvrissement en glucose et/ou en oxygène, et qu'elles activent la réponse UPR.

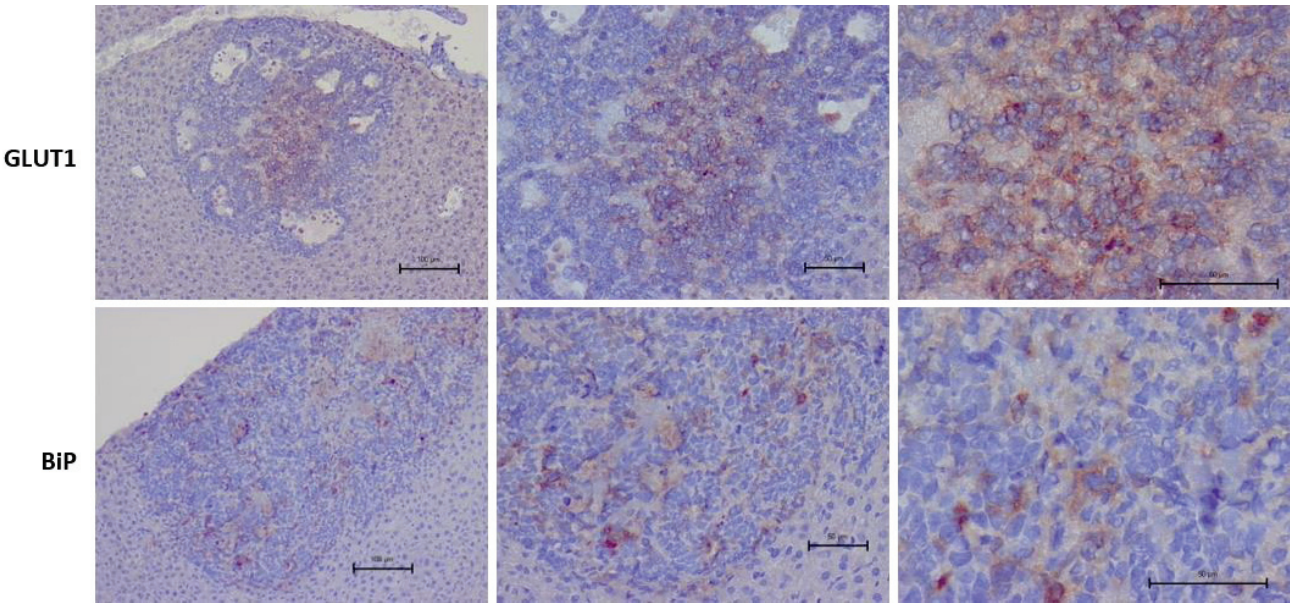


Figure 18 : Marquage GLUT1 et BiP sur coupe histologique de foie de souris allogreffées avec les cellules STC-1.

Les cellules STC-1 sont injectées dans la rate de souris athymiques où elles développent une tumeur solide primaire puis se disséminent jusqu'au foie par la veine porte. Au niveau du foie, elles développent des nodules intrahépatiques. Les coupes histologiques du foie sont marquées à l'aide d'anticorps immunohistochimiques ciblant les protéines GLUT1 ou BiP.

Quel est l'impact des modulateurs de l'UPR sur le développement des nodules intrahépatiques ?

Les souris allogreffées ont été traitées avec les 5 molécules modulant l'UPR évaluées *in vitro,* le GSK2656157, le salubrinal, l'arctigénine, le bortezomib et le 4-PBA (Figure 19). Du NaCl est injecté aux souris du groupe contrôle. La moyenne des surfaces tumorales hépatiques de chaque groupe rapportées aux surfaces hépatiques totales est évaluée. La surface tumorale hépatique s'élève à 10,1 ± 1,0 % pour le groupe contrôle. Le RAD001 possède un fort effet anti-tumoral, conformément à ce qui a été décrit (Bollard et al. 2013) avec une surface tumorale de 0,7 ± 0,3 % (p<0.001). La surface tumorale hépatique pour les souris traitées avec le GSK2656157 diminue de moitié et s'élève à 5,1 ± 1,3 % (p<0.01). Les molécules bortezomib et 4-PBA entrainent la plus forte inhibition de la croissance tumorale avec une surface tumorale de 1,7 ± 1,1 % (p<0.01) et de 2,4 ± 0,8 % (p<0.001) respectivement. L'arctigénine induit une diminution d'environ 60% de l'invasion hépatique avec une surface tumorale de 4,2 ± 2,8 % (p<0.05). Enfin, le salubrinal n'a pas d'effet sur la croissance tumorale avec une surface tumorale qui s'élève à 8,7 ± 3,7 %.

Ces résultats montrent de façon paradoxale que des molécules qui activent un SRE (bortezomib, arctigénine), ou qui inhibent l'UPR (4-PBA, GSK2656157) peuvent inhiber le développement des nodules intrahépatiques.

Pour conclure sur l'effet des modulateurs de l'UPR sur le développement tumoral, nos résultats suggèrent que l'UPR pourrait être ciblé dans le traitement des NNE GI. L'inhibition de la voie PERK, sans doute activée suite à la baisse du taux de nutriments ou d'oxygène au sein des nodules intrahépatiques, par le GSK2656157 diminue la croissance tumorale. Nous confirmons *in vivo* le potentiel anti-tumoral de l'arctigénine et du bortezomib. Enfin, malgré l'observation d'effets opposés suivant le SRE induit *in vitro*, le 4-PBA inhibe fortement la croissance tumorale dans ce modèle murin.

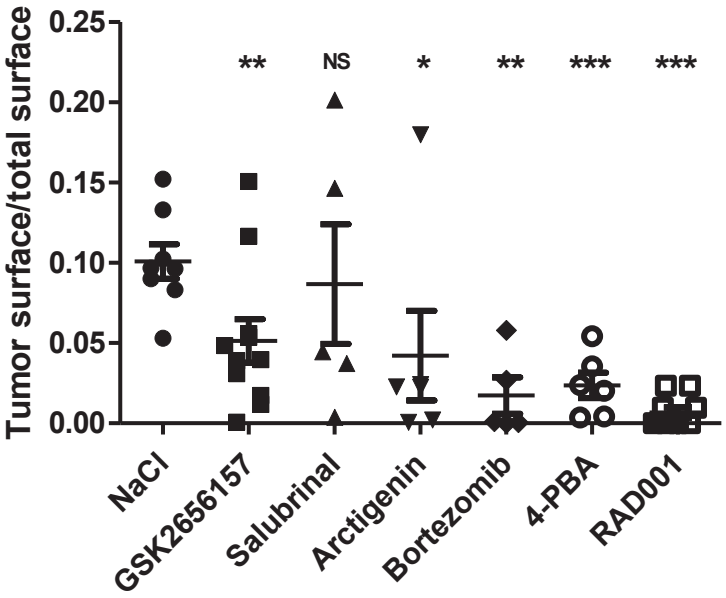


Figure 19 : Impact des modulateurs de l'UPR sur le développement des nodules intrahépatiques après injection intrasplénique de cellules STC-1.

Les cellules STC-1 sont injectées dans la rate de souris athymiques. Après une semaine, les souris sont traitées avec les molécules suivantes. GSK2656157 : gavage à 100 mg/kg/jour, 5 jours sur 7 (n=11), salubrinal : injection intrapéritonéale (IP) à 1,5 mg/kg/jour, 5 jours sur 7 (n=5), arctigénine : injection IP à 50 µg/kg/jour, 5 jours sur 7 (n=6), bortezomib : injection IP à 1 mg/kg/jour, 5 jours sur 7 (n=5), 4-PBA : gavage à 250 mg/kg 2 fois par semaine (n=6), RAD001 : injection IP à 1,5 mg/kg/jour, 5 jours sur 7 (n=10). A bout de 14 jours de traitement, les souris sont sacréfiées et les foies prélevés pour évaluer la surface tumorale sur coupe histologique du foie à l'aide du logiciel Histolab. Note : *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$; NS, non significatif.

2. L'UPR CONTROLE-T-IL LA VOIE MTORC1 DANS LES CELLULES DE NNE GI ?

Nous avons démontré que la thapsigargine provoque l'activation de la voie mTORC1, par la phosphorylation des effecteurs p70S6K1 et 4E-BP1 (Figure 3A de l'article publié dans le journal Oncotarget). Nous nous sommes demandés si l'inhibition de l'UPR provoquait l'effet inverse. Nous avons donc traité les cellules STC-1 avec la molécule 4-PBA, qui inhibe les voies de l'UPR lorsque les cellules sont en condition de SRE induit par la déplétion en glucose (Figure 12C). Dans les conditions de déplétion en glucose, on observe la suractivation de la voie mTORC1 (Figure 3C de notre article).

Le traitement des cellules après 3 jours de déplétion en glucose avec le 4-PBA pendant 24h diminue la phosphorylation de p70S6K1, démontrant la diminution de l'activation de la voie mTORC1, lorsque l'UPR est inhibé (Figure 20).

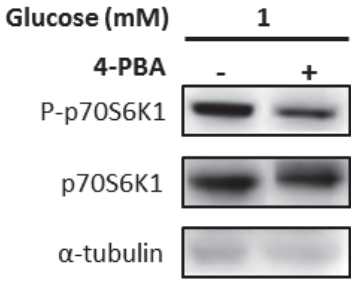


Figure 20 : Effet de la molécule 4-PBA sur un des effecteurs de la voie mTOR p70S6K1.

Les cellules STC-1 sont cultivées dans le milieu de référence contenant 1 mM de glucose pendant 3 jours puis les cellules sont traitées par le 4-PBA à 100 µM pendant 24h. L'expression de phospho-p70S6K1 et de la forme totale p70S6K1 est analysée par western-blot. Les expériences ont été conduites 3 fois.

3. QUEL EST LE ROLE DE LA VOIE PERK DANS LE DEVELOPPEMENT TUMORAL ET PEUT-ON LA CIBLER ?

Les résultats de l'article « mTOR inhibitors activate PERK signaling and favor viability of gastrointestinal neuroendocrine cell lines » démontrent l'effet délétère sur la viabilité cellulaire de l'association d'un inhibiteur de PERK et de la rapamycine (Figure 6 de l'article). Suite à ces résultats démontrant le potentiel pro-survie de PERK, les questions suivantes se sont posées :

- La co-inhibition de la voie mTOR et de la voie PERK est-elle bénéfique *in vivo* également ?
- Confirme-t-on l'effet pro-survie de PERK grâce à une seconde méthode d'inhibition de cette voie ?

3.1. L'inhibition de la voie mTOR et de la voie PERK est-elle bénéfique *in vivo* ?

Nous avons conduit une expérience *in vivo* à l'aide du modèle de dissémination métastatique de NNE GI, présenté dans la partie Résultats 1.2.1. Les résultats sont présentés Figure 21.

Une semaine après l'injection intra-splénique des cellules STC-1, nous avons comparé l'effet de l'inhibtion de PERK par le GSK2656157 à celui du traitement de référence : inhibition de mTOR par le RAD001. Connaissant le puissant effet du RAD001 sur la croissance tumorale, il a été administré à 2 pososlogies différentes, afin de pouvoir observer l'éventuel effet de l'association avec le GSK2656157. La plus forte dose de RAD001 diminue fortement la surface tumorale : 0,7 ± 0,3 % (p<0,001), comparé au contrôle dont la surface tumorale est de 10,1 ± 1,0 %. Le traitement des souris avec une dose 2 fois inférieures de RAD001 (0,75 mg/kg/jour) entraine une diminution d'environ 70 % de la surface tumorale (3,1 ± 1,0 % ; p<0,01). Le traitement avec l'inhibiteur de PERK GSK2656157 provoque une baisse de 50% de la surface tumorale (5,1 ± 1,3%, p<0,01). L'association de l'inhibiteur de mTOR (aux deux concentrations) et de l'inhibiteur de PERK n'a pas d'effet anti-tumoral synergique comparé à celui de RAD001 administré seul. La surface tumorale moyenne passe de 0,8 ± 0,3 % à 2,4 ± 1,1 % pour l'association avec la plus forte dose de RAD001, et de 3,1 ± 1,0 % à 2,9 ± 1,1 % pour l'association avec la dose plus faible de RAD001.

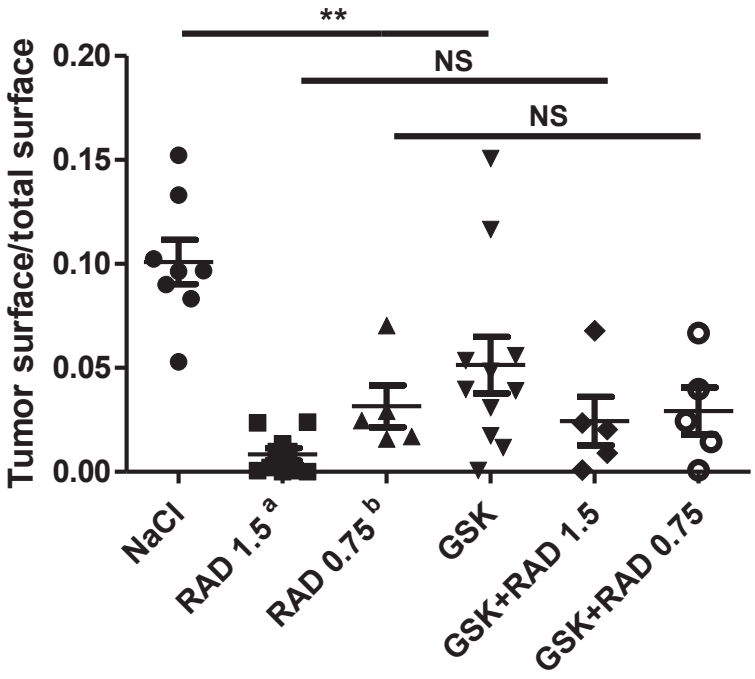


Figure 21 : Impact de l'association d'un inhibiteur de mTOR RAD001 et d'un inhibiteur de PERK GSK2656157 sur le développement des nodules intrahépatiques après injection intrasplénique de cellules STC-1.

Les cellules STC-1 sont injectées dans la rate de souris athymiques. Après une semaine, les souris sont traitées avec les molécules suivantes.RAD 1,5 : injection IP à 1,5 mg/kg/jour, 5 jours sur 7 (n=10), RAD 0,75 : injection IP à 0,75 mg/kg/jour, 5 jours sur 7 (n=5), GSK : gavage de GSK2656157 à 100 mg/kg/jour, 5 jours sur 7 (n=11), RAD1,5+GSK (n=5), RAD0,75+GSK (n=5). L'évaluation de la surface tumorale est effectuée sur coupe histologique du foie à l'aide du logiciel Histolab. Note : [a], p<0,001 ; [b] et **, p<0.01 ; NS, non significatif.

3.2. Confirme-t-on l'effet pro-survie de la voie PERK ?

3.2.1. Inhiber PERK grâce à une seconde méthode non pharmacologique entraine-t-il une diminution de la viabilité cellulaire ?

Suite aux résultats publiés dans notre article, démontrant le rôle pro-survie de la voie PERK dans les cellules de NNE GI traitées par un inhibiteur de mTOR, nous avons voulu confirmer ce rôle grâce à une seconde méthode d'inhibition, la méthode d'invalidation de gène CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats-CRISPR associated protein 9).

Présentation de la méthode CRIPSR-Cas9

Afin de générer un modèle cellulaire déficient pour le gène codant pour la protéine PERK, nous avons utilisé la technique CRISPR-Cas9. Pour cela, nous avons choisi un ARN guide, permettant de cibler le gène codant pour la protéine PERK, *eif2aK3.* Ces séquences d'oligonucléotides ciblant *eif2aK3* ont été choisies dans la banque GeCKO puis achetées à la société Integrated DNA Technologies (Leuven, Belgique). Les séquences choisies sont les suivantes : CACCGCATGGAGGCCGTCCCCTTCA et AAACTGAAGGGGACGGCCTCCATGC. Ces séquences ont été hybridées puis liées au plasmide lentiCRISPR v2 (offert par Dr Feng Zhang, #52961, Addgene, Cambridge, Massachussets) (Sanjana, Shalem, et Zhang 2014) au niveau du site de restriction *BsmB*I, conformément au protocole fourni par GeCKO (GeCKO Target Guide Sequence Cloning Protocol) (Figure 22). Il en résulte un plasmide lentiCRISPR v2-PERK, que nous amplifions ensuite grâce aux bactéries Stbl3 (Thermo-Fisher).

Le plasmide est ensuite purifié grâce au kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Allemagne). Les cellules STC-1 sont transfectées avec le plasmide lentiCRISPR v2-PERK à l'aide de l'agent de transfection Attractène (Qiagen), selon le protocole recommandé par le fournisseur. La sélection des clones cellulaires ayant intégrés le plasmide est effectuée grâce à l'antibiotique puromycine (10 µg/mL, 72 heures) ajouté 24 heures après l'étape de transfection. Après les 72 heures en présence de puromycine, le milieu est remplacé par du milieu de culture habituellement utilisé (DMEM 5% SVF, 100 UI/mL de pénicilline + 100 µg/mL de streptomycine). Les clones sont ensuite sélectionnés et repiqués en plaque 96 puits afin de favoriser leur croissance. A confluence, les cellules sont ensemencées dans une plaque 48 puits et ainsi de suite en augmentant la surface des puits afin de les amplifier. Les clones choisis pour mener les expériences sont sélectionnés en recherchant par western-blot l'expression des protéines de la voie PERK.

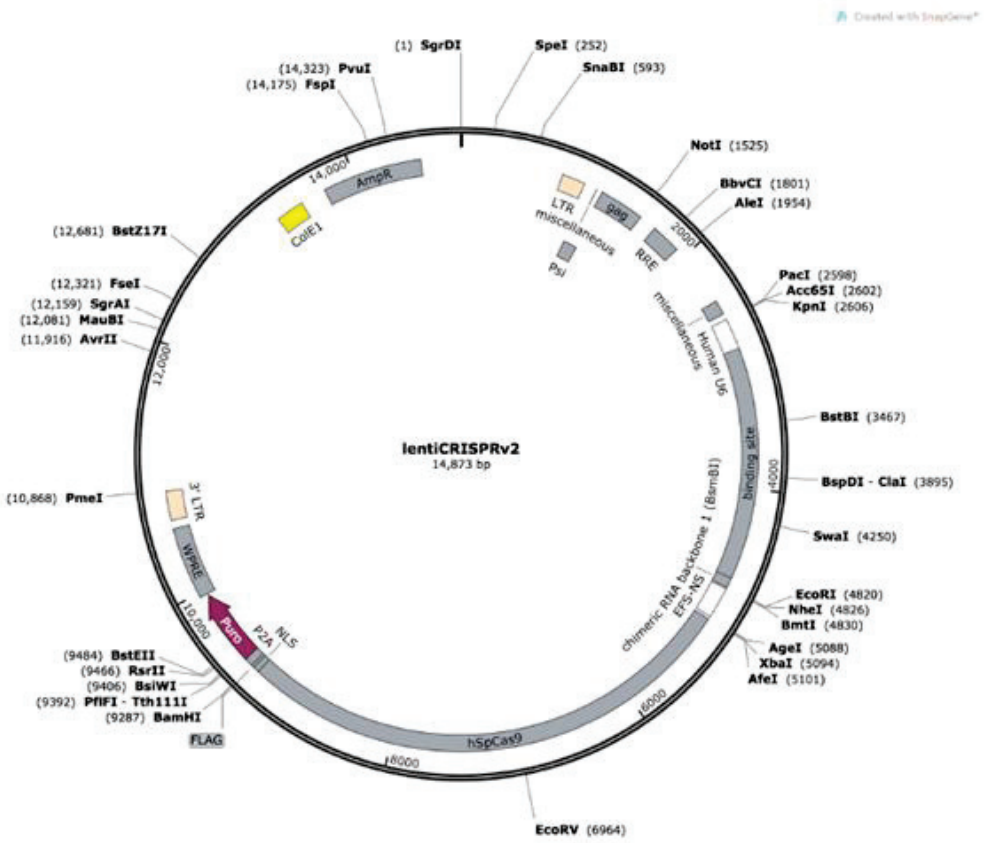


Figure 22 : Schéma du plasmide lentiCRISPRv2 (#52961, Addgene).

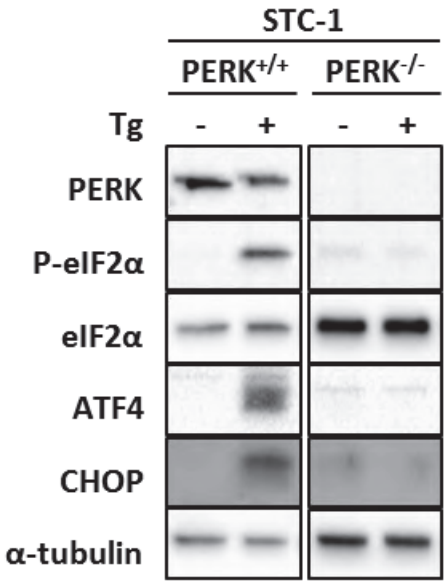


Figure 23 : Evaluation de l'inhibition de la voie PERK dans des cellules STC-1 PERK+/+ et PERK-/-.

Les cellules sont traitées ou non avec la thapsigargine (Tg, 300 nM) pendant 4h. L'expression des protéines de la voie PERK est analysée par western-blot. L'α-tubuline est le contrôle interne.

Résultats

Nous avons sélectionné un clone, appelé PERK$^{-/-}$ pour lequel l'expression de la protéine PERK est absente (Figure 23). Le traitement avec la thapsigargine n'induit pas l'expression des protéines de la voie PERK dans les cellules PERK$^{-/-}$, démontrant l'absence d'expression de la protéine effectrice PERK, mais également l'absence de mise en place de moyen de compensation de cette voie par d'autres facteurs. Au contraire, la voie PERK est entièrement activée dans les cellules PERK$^{+/+}$, démontrée par la phosphorylation de la protéine eIF2α et la nette augmentation de l'expression d'ATF4 et de CHOP, suite au traitement par la thapsigargine. Nous avons ensuite procédé à l'étude de viabilité par tests MTT sur ce clone.

Dans un premier temps, nous avons soumis les cellules PERK$^{+/+}$ et les cellules PERK$^{-/-}$ à la déplétion en glucose du milieu (1 mM *versus* 25 mM de glucose) pendant 24 et 48 heures, afin d'évaluer l'impact d'une inhibition totale de la voie PERK sur la viabilité cellulaire (Figure 24). La déplétion en glucose entraine une diminution de la viabilité cellulaire de 38,4% et de 31,6% pour les cellules PERK$^{+/+}$ après 24 et 48 heures respectivement. L'inhibition de PERK augmente cette perte de viabilité de 36,4% et 52,2% après 24 et 48h de déplétion respectivement (p<0,05).

Dans un second temps, nous avons évalué l'effet de l'ajout de la rapamycine pendant 24h sur la viabilité cellulaire dans des conditions de culture habituelles (25 mM glucose) ou lors d'une déplétion en glucose (1 mM glucose) (Figure 25). En condition de culture cellulaire normale et en présence de rapamycine, la viabilité cellulaire s'élève à 73,8% dans les cellules PERK$^{+/+}$. Dans les mêmes conditions, les cellules PERK$^{-/-}$ présentent une viabilité cellulaire de 54,7%, soit une baisse d'environ 20%. En condition de stress, induit ici par la déplétion en glucose pendant 24 heures, les cellules souches présentent une viabilité de 69,2% en présence de rapamycine, et les cellules PERK$^{-/-}$ une viabilité de 46,0%, soit une chute de 23%.

Ces expériences d'inhibition génétique de la voie PERK permettent de confirmer le rôle pro-survie de PERK dans les cellules STC-1 soumises à une déplétion en glucose d'une part, et elles appuient les résultats démontrant l'intérêt pro-survie de la voie PERK lors d'un traitement à la rapamycine d'autre part. Ces résultats doivent à présent être confirmés dans un second clone PERK$^{-/-}$.

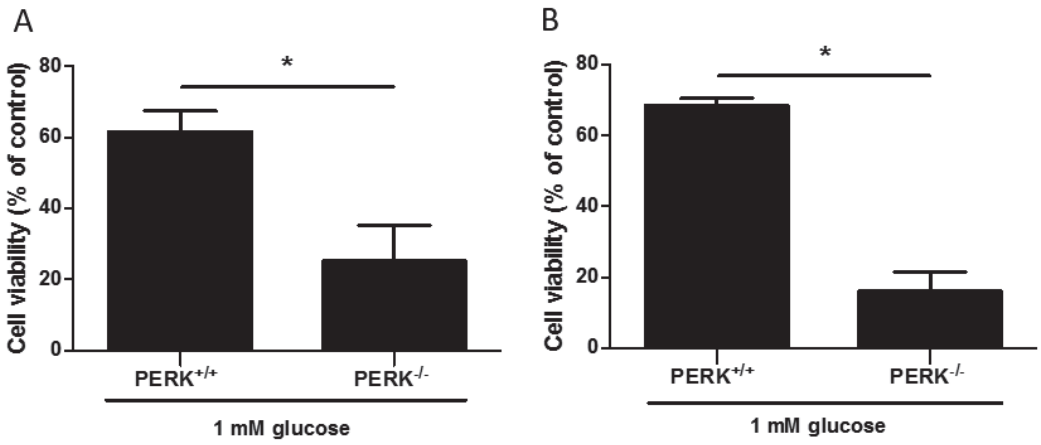


Figure 24 : Impact de l'inhibition de PERK sur la viabilité des cellules STC-1 en condition de SRE.

Les cellules STC-1 $PERK^{+/+}$ et $PERK^{-/-}$ sont cultivées dans les conditions de culture habituelles (contrôle) ou sont soumises à une déplétion en glucose (1 mM glucose) pendant 24h (A) et 48h (B). La viabilité cellulaire est évaluée grâce au test MTT et elle est représentée ici comme le ratio de la densité optique (DO) de la condition donnée par rapport à la DO de la condition contrôle (cellules $PERK^{+/+}$ ou $PERK^{-/-}$ cultivées à 25 mM de glucose). Note : *, $p<0,05$. Les graphiques représentent la moyenne de 3 expériences (moyenne ± SEM).

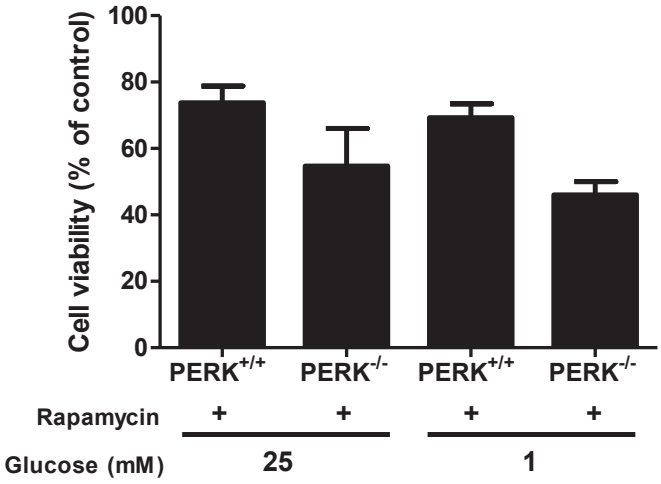


Figure 25 : Impact de l'inhibition de PERK sur la viabilité des cellules STC-1 en présence de rapamycine avec ou sans condition de SRE.

Les cellules STC-1 $PERK^{+/+}$ et $PERK^{-/-}$ sont cultivées dans les conditions de culture habituelles (contrôle) pendant 48h puis elles sont traitées à la rapamycine (10 nM) pendant 24h, en présence de glucose (25 mM glucose) ou en condition de déplétion en glucose (1 mM glucose). La viabilité cellulaire est évaluée grâce au test MTT et elle est représentée ici comme le ratio de la densité optique (DO) de la condition donnée par rapport à la DO de la condition contrôle (cellules $PERK^{+/+}$ ou $PERK^{-/-}$ cultivées à 25 mM de glucose sans rapamycine)
Les graphiques représentent la moyenne de 3 expériences (moyenne ± SEM).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les NNE GEP regroupent un ensemble de tumeurs d'une grande hétérogénéité du point de vue morphologique, prolifératif et évolutif. Nous avons vu que la classification OMS de 2010 distingue 3 grades tumoraux qui possèdent leurs spécificités propres. La prise en charge et le traitement de chacun des 3 grades se font en fonction de leur particularité.

Ces dernières années, l'essor considérable des thérapies ciblées a changé le devenir de nombreux types de cancer. L'évérolimus, inhibiteur de la voie mTOR, est actuellement utilisé dans la prise en charge des TNE pancréatiques progressives, non résécables ou métastatiques. Il est également autorisé pour la prise en charge des TNE progressives, non résécables ou métastatiques d'origine gastro-intestinale ou pulmonaire par la FDA. Les essais précliniques menés dans les modèles *in vitro* et *in vivo* de NNE GI démontrent l'efficacité des inhibiteurs de mTOR (Couderc et al. 2011; Bollard et al. 2013). Deux essais cliniques sont en cours afin d'évaluer l'efficacité de l'évérolimus dans la prise en charge des CNE (NCT02113800 et NCT02248012). Ces données suggèrent que ces thérapies pourraient être utilisées en seconde ligne, voire en association au traitement de référence des CNE.

Néanmoins, des absences de réponses, des rechutes post-traitements ou des phénomènes de résistance à ces thérapies sont observés. La compréhension des mécanismes de résistance et la recherche de nouvelles cibles pour le traitement des NNE GEP sont nécessaires.

Mon travail de thèse s'inscrit dans ce contexte. Nous avons exploré le SRE et la réponse UPR dans un modèle cellulaire de NNE GI, puis nous avons ciblé pharmacologiquement l'UPR dans un modèle de dissémination métastatique, afin d'évaluer si l'UPR peut constituer une nouvelle cible thérapeutique. Nous avons également étudié la réponse UPR lors du traitement par inhibiteurs de mTOR et analysé si une interaction entre l'UPR et la voie mTOR existe dans les cellules de NNE GI. Dans cette dernière partie du manuscrit, nous discutons des résultats et des perspectives qui découlent de ces travaux.

Les facteurs de SRE dans les NNE GI

Les facteurs de SRE habituellement retrouvés au sein d'une tumeur sont la déplétion en nutriments et la diminution de l'oxygène sanguin, en conséquence d'une mauvaise vascularisation et d'une architecture vasculaire immature des tumeurs. Nous avons donc recherché la présence de facteurs de SRE dans le modèle murin de dissémination métastatique de NNE GI. GLUT1 a été décrit

comme un marqueur des zones hypoxiques tumorales dans un modèle murin de TNE pancréatique (RIP1Tag2) (Allen et al. 2016). Le marquage GLUT1 central que nous observons au sein des nodules suggère la présence de zones hypoxiques et/ou appauvries en glucose. Ces résultats corrèlent avec l'étude de Pourreyron *et al*., qui a démontré que de larges vaisseaux péri-tumoraux et un réseau vasculaire immature central se trouvent dans les nodules intrahépatiques du même modèle murin (Pourreyron et al. 2008). L'expression de BiP, marqueur de la réponse UPR, est plus diffuse et ne colocalise pas avec l'expression de GLUT1. Cela suggère que son expression dépend plus des capacités de sécrétions d'hormones des cellules tumorales que de facteurs de SRE comme l'hypoxie. Néanmoins, il est nécessaire de compléter l'étude de l'activation de l'UPR au sein des nodules intrahépatiques avec d'autres marqueurs d'activation des 3 voies de l'UPR.

L'UPR dans les NNE GI et intérêt de la voie PERK

Parmi les cellules neuroendocrines, les études de l'UPR concernent principalement les cellules β-pancréatiques. En effet, l'UPR joue un rôle majeur dans l'adaptation des cellules possédant une forte capacité sécrétrice et des dysfonctionnements des voies de l'UPR peuvent être à l'origine de pathologies liées à l'accumulation de protéines dans le RE. Une perte de fonction de la kinase PERK est à l'origine du syndrome de Wolcott-Rallison chez l'homme, caractérisé par un diabète juvénile (Delépine et al. 2000). Les souris invalidées pour le gène PERK développent dès les premières semaines de vie un diabète, dû à la destruction des cellules β du pancréas (Harding et al. 2001). Il a été démontré que la survie des cellules β-pancréatiques, la synthèse et la sécrétion d'hormones nécessitent l'activation de l'UPR (Hartley et al. 2010; D. Feng et al. 2009; J. Y. Chan et al. 2015). Dans un modèle murin d'insulinome, Gupta *et al.* ont démontré que PERK jouait un rôle dans le développement tumoral et dans l'angiogenèse durant la progression tumorale (Gupta, McGrath, et Cavener 2009).

Cependant aucune étude n'a décrit l'UPR dans les lignées cellulaires de NNE GI. Parmi les lignées cellulaires disponibles au laboratoire, les cellules STC-1 et GluTag présentent une activation de la voie mTORC1 (Couderc et al. 2011). Du fait de l'existence d'interactions entre la voie mTORC1 et l'UPR (Appenzeller-Herzog et Hall 2012), et de par leur forte capacité de synthèse et sécrétion d'hormones, nous avons exploré la réponse UPR dans ces 2 lignées.

Nous avons étudié l'activation de l'UPR en réponse à 2 facteurs de SRE : la déplétion en glucose et l'hypoxie. Nous montrons que les 2 lignées activent les 3 voies de l'UPR suite à l'hypoxie,

conduisant à l'expression du facteur pro-apoptotique CHOP et au clivage de la caspase 3. Lors d'une déplétion en glucose, l'UPR est activé de façon partielle car seules les voies PERK et ATF6 sont induites, et cette activation ne conduit pas à l'expression de CHOP et de la caspase 3 clivée. Les cellules STC-1 et GluTag semblent donc plus sensibles à l'hypoxie qu'à la déplétion en glucose. La réponse partielle de l'UPR engendrée par la déplétion en glucose semble donc cytoprotectrice, alors que la réponse UPR complète suite à l'hypoxie conduit à l'apoptose cellulaire.

La voie PERK est particulièrement étudiée dans l'oncogenèse, notamment du fait de son rôle déterminant dans la balance survie/mort de l'UPR. Cette protéine participe à l'initiation et à la progression tumorale (Bobrovnikova-Marjon et al. 2010), et des molécules spécifiques inhibitrices de sa phosphorylation sont en essai préclinique. Nous avons donc étudié l'impact de l'inhibition de cette voie sur la viabilité cellulaire par inactivation du gène codant pour PERK, puis nous avons évalué l'effet d'une molécule inhibant l'activation de PERK dans le modèle de dissémination métastatique de NNE GI.

Suite à l'inactivation du gène codant pour PERK dans les cellules STC-1, nous confirmons le rôle pro-survie de cette voie lors d'une déplétion en glucose de 24 heures *in vitro*. Cela corrèle avec les données de la littérature, qui montrent que la délétion de PERK ou de ses effecteurs ATF4 ou Nrf2, ou qu'une mutation du site de phosphorylation d'eIF2α sur la sérine 51, entrainent une diminution de la survie cellulaire suite à un SRE dans d'autres types cellulaires (Cullinan et al. 2003; Bi et al. 2005; Jiangbin Ye et al. 2010). Il serait intéressant d'évaluer le rôle de la voie PERK sur la survie cellulaire suite à l'hypoxie, en soumettant les cellules STC-1 $PERK^{-/-}$ aux conditions hypoxiques. La présence de l'expression de CHOP nous suggère que le rôle de la voie PERK lors d'une situation d'hypoxie durant 24 heures peut être en faveur de l'apoptose, car le stress subi est trop intense ou trop long.

Enfin, l'étude de l'activation des deux autres voies de l'UPR, IRE1 et ATF6, suite à différents facteurs de stress est nécessaire pour comprendre leurs rôles respectifs dans la survie cellulaire.

Pour étudier l'impact de l'inhibition de PERK sur la croissance des nodules intrahépatiques dans le modèle de dissémination métastatique de NNE GI, nous avons traité les souris avec la molécule GSK2656157 puis évalué la surface tumorale hépatique. Les résultats montrent que cette molécule réduit le développement des nodules intrahépatiques. *In vitro*, GSK2656157 ne diminue la viabilité cellulaire qu'en présence de thapsigargine. La différence entre l'effet observé *in vitro* et *in vivo* pour cette molécule peut s'expliquer par la complexité qu'apportent le microenvironnement

tumoral et la réponse de la tumeur aux stimuli induits par le microenvironnement. Les expériences *in vivo* sont menées sur des souris athymiques. Les effets des molécules sur la croissance tumorale sont donc indépendants d'une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T matures. On peut donc penser que l'impact du microenvironnement sur les tumeurs reposera principalement sur la variation du taux de nutriments ou d'oxygène.

Ces résultats montrent que la voie PERK est impliquée dans le développement et la croissance des nodules intrahépatiques dans le modèle murin de NNE GI. Dans un modèle murin de cancer du sein, la délétion du gène codant PERK entraîne un retard dans la croissance tumorale et réduit les lésions métastatiques. L'un des mécanismes proposé est le dommage oxydatif causé à l'ADN dans les cellules de cancer du sein dont l'expression de PERK est inhibée (Bobrovnikova-Marjon et al. 2010). Dans le modèle de dissémination métastatique, il serait intéressant d'étudier : 1) l'effet de l'inactivation de PERK sur la croissance métastatique, grâce à l'injection de cellules STC-1 $PERK^{-/-}$; 2) d'évaluer à quelle(s) étape(s) du développement tumoral la voie PERK entre en jeu. Cet aspect pourra être étudié grâce au modèle murin de greffe orthotopique caecale de NNE, décrit par Poncet *et al*. Ce modèle permet de reproduire les différentes étapes de la progression d'un NNE, à savoir la croissance et l'invasion locale au niveau de la paroi caecale d'une souris athymique, puis la dissémination ganglionnaire et hépatique (Poncet et al. 2009).

Une étude de l'activation de l'UPR a été menée sur 49 échantillons tumoraux de patients atteints de TNE pancréatiques. Une augmentation de l'expression protéique de BiP, ATF4 et CHOP est retrouvée dans le tissu tumoral comparé au tissu sain (Klieser et al. 2015). Nous prévoyons d'analyser l'expression des protéines de l'UPR par marquage immunohistochimique, sur une série de TNE pancréatiques et gastro-intestinales. L'expression des marqueurs de l'UPR sera analysée en fonction du grade, du stade ou de la localisation tumorale, afin d'identifier si l'activation de l'UPR peut être un facteur pronostique.

Ces études permettront de comprendre l'implication de l'UPR dans le développement tumoral et d'évaluer la possibilité de cibler une ou plusieurs voies de l'UPR pour le traitement des NNE GI.

L'UPR comme nouvelle cible dans le traitement des NNE GI

Nous avons évalué l'efficacité anti-tumorale *in vivo* de 4 autres molécules modulatrices de l'UPR, en plus du GSK2656157 discuté plus haut, à savoir le salubrinal, l'arctigénine, le bortezomib et le 4-PBA.

Une grande disparité des résultats sur les souris traitées avec le salubrinal est observée. Les résultats *in vitro* montrent que le salubrinal entraine la mort des cellules traitées à la thapsigargine, alors qu'il protège les cellules en déplétion en glucose. L'importante disparité des résultats *in vivo* peut s'expliquer d'une part parce qu'au sein même des nodules peuvent exister différents inducteurs de stress (hypoxie, déplétion en nutriment, synthèse accrue d'hormone) entrainant une variabilité intra-individuelle. D'autre part, une variabilité interindividuelle de la vitesse de développement des nodules peut aussi exister entre chaque souris du même groupe.

L'arctigénine induit l'apoptose des cellules quelque soient les conditions (à l'état basal, par un SRE induit par la thapsigargine ou la déplétion en glucose). Elle montre aussi un effet anti-tumoral *in vivo*. Cependant, cette molécule, décrite pour inhiber l'expression de P-PERK, ATF4, CHOP et BiP lors d'une déplétion en glucose dans les cellules HT-29 de cancer du côlon (J.-Y. Kim et al. 2010) n'induit pas les mêmes réponses dans les cellules STC-1. Elle inhibe effectivement la phosphorylation de PERK, mais augmente l'expression d'ATF4, de CHOP et de BiP. En parallèle, elle augmente l'expression de P-eIF2α et entraine le clivage de la caspase 3, comme décrit dans les cellules de cancer du côlon. La forte phosphorylation d'eIF2α pourrait s'expliquer par l'induction d'une ou de plusieurs kinases connues pour phosphoryler eIF2α, à savoir HRI, PKR et GCN2. L'augmentation de l'expression de BiP signe plutôt une induction de la réponse UPR. Ainsi, dans les cellules de NNE GI, l'arctigénine peut être décrite comme une molécule induisant l'UPR.

La molécule bortezomib inhibe le protéasome après 8 heures de traitement, sans induction des trois voies de l'UPR à ce temps. Au contraire, après 24h de traitement, le bortezomib induit la voie PERK et la voie ATF6, et entraine l'apoptose. La diminution de la viabilité cellulaire observée après 24 heures de traitement corrèle avec la mise en évidence du clivage de la caspase 3. Administrée chez la souris, cette molécule diminue également la croissance des nodules intrahépatiques.

La molécule 4-PBA entraine *in vitro* une induction de l'UPR à l'état basal, et une inhibition de l'UPR induit par la déplétion en glucose. L'induction de l'UPR à l'état basal est cytotoxique, alors que l'inhibition de l'UPR induit par la déplétion en glucose protège la cellule. *In vivo*, le 4-PBA inhibe la

croissance des nodules intrahépatiques dans le modèle de dissémination métastatique. Son effet inhibiteur est comparable à celui de l'évérolimus.

L'action de ces molécules sur les voies de l'UPR devra être confirmée *in vivo*, à l'aide par exemple de marquages immunohistochimiques des nodules des souris traitées. Cela permettra de préciser leur mécanisme d'action dans un contexte se rapprochant des conditions rencontrées au sein des tumeurs humaines. De plus, certains groupes de souris ne contenaient que 5 ou 6 souris, ce qui nécessite la mise en place d'une expérience de confirmation des résultats sur un plus grand nombre de souris.

Des molécules connues pour diminuer le niveau de SRE comme le 4-PBA ou le GSK2656157 sont anti-tumorales dans le modèle de dissémination métastatique. Paradoxalement, nous démontrons aussi que des molécules induisant un SRE comme le bortezomib ou l'arctigénine ont un effet anti-tumoral. Toutefois, l'effet anti-tumoral du bortezomib et de l'arctigénine ne peut pas être attribué qu'à l'action sur l'UPR. En effet, le bortezomib est un inducteur indirect de l'UPR via l'accumulation de protéines non éliminées par le protéasome. L'un des premiers mécanismes d'action décrit pour les inhibiteurs du protéasome est l'inhibition de l'activité du facteur de transcription NF-κB, qui joue un rôle très important dans la croissance et la chimiorésistance de nombreux types tumoraux, dont les cellules de myélome multiple (Mitsiades et al. 2002). L'arctigénine a également d'autres effets que l'induction de l'UPR, qui différent selon le type cellulaire. Il a été décrit une inhibition de la voie PI3K/Akt dans les cellules d'hépatocarcinome HepG2 (Lu et al. 2015), l'arrêt du cycle cellulaire en phase G_0/G_1 des cellules d'adénocarcinome du poumon (Susanti et al. 2013) ou l'inhibition de l'angiogenèse dans des cellules de cancer du côlon CT26.WT (Gu et al. 2013).

Les résultats paradoxaux de nos expériences *in vivo*, démontrant un effet anti-tumoral pour les molécules inductrices et inhibitrices de l'UPR peuvent provenir des effets « off-target » de certaines molécules. De plus, ces résultats peuvent être la conséquence de la dualité fonctionnelle des voies de l'UPR. Il est difficile de prédire l'effet des molécules modulant l'UPR car il peut favoriser aussi bien la survie que la mort cellulaire. La redondance des effets entre les voies de l'UPR est aussi un facteur à prendre en compte : l'inhibition d'une voie peut être compensée par la suractivation d'une autre.

Ces molécules peuvent aussi agir sur les cellules du microenvironnement tumoral, comme les cellules endothéliales. Ainsi, l'effet observé sur la tumeur peut résulter d'une action sur

l'ensemble des types cellulaires retrouvés au sein de la tumeur. Cela explique aussi les différences entre les expériences menées *in vitro* et *in vivo*.

Un autre facteur important est le moment auquel la molécule est administrée. En effet, l'UPR est une réponse dynamique à un état de stress. Selon le stade de développement, il peut favoriser ou au contraire être délétère pour la survie. Une molécule perturbant l'UPR pourra donc avoir un effet différent suivant le moment où elle a été administrée.

Savoir quand administrer une molécule modulant l'UPR au cours de l'évolution d'une tumeur pour qu'elle ait le meilleur effet anti-tumoral est un futur challenge. Le développement d'une « signature moléculaire de l'UPR » afin de caractériser son activation trouve tout son sens ici. Un choix devra être fait, sans doute au cas par cas, entre l'inhibition de la réponse UPR cytoprotective au début de la tumorigenèse, ou au contraire la suractivation du SRE déjà présent dans une tumeur d'un stade plus avancé, afin d'induire une apoptose plus rapide.

L'UPR comme nouveau moyen de résistance aux thérapies ciblant mTOR

L'effet de la balance mort/survie de l'UPR repose, entre autre, sur son interaction avec d'autres voies de signalisation cellulaire pouvant accroitre la survie des cellules tumorales au cours du SRE. Des études de notre équipe ont démontré que la voie mTOR est activée *in vitro* et *in vivo* dans les modèles de NNE GI et que les inhibiteurs de mTOR rapamycine et évérolimus inhibent la prolifération cellulaire et ont un effet anti-tumoral *in vivo* (Couderc et al. 2011; Bollard et al. 2013). Cette voie est également activée chez les patients atteints de CNE (Catena et al. 2011) et une forte expression des marqueurs de l'activation de la voie est corrélée à une survie plus courte (Maximilian Heetfeld et al. 2013).

Au cours de nos travaux, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre la voie mTOR et l'UPR. Connaissant la dualité de la réponse UPR, l'interaction mTOR/UPR pourrait être bénéfique dans le contexte de résistance aux inhibiteurs de mTOR, ou inversement en favorisant l'effet des inhibiteurs de mTOR. Des données de la littérature ont démontré que la voie mTOR pouvait agir en amont ou en aval de l'UPR, en fonction du type cellulaire et du moyen d'induction d'un SRE. Cette interaction peut être bénéfique pour la cellule : l'induction de l'UPR suite à l'activation de mTOR permet de diminuer la synthèse protéique et le SRE dans les cellules MEF (U. Ozcan et al. 2008).

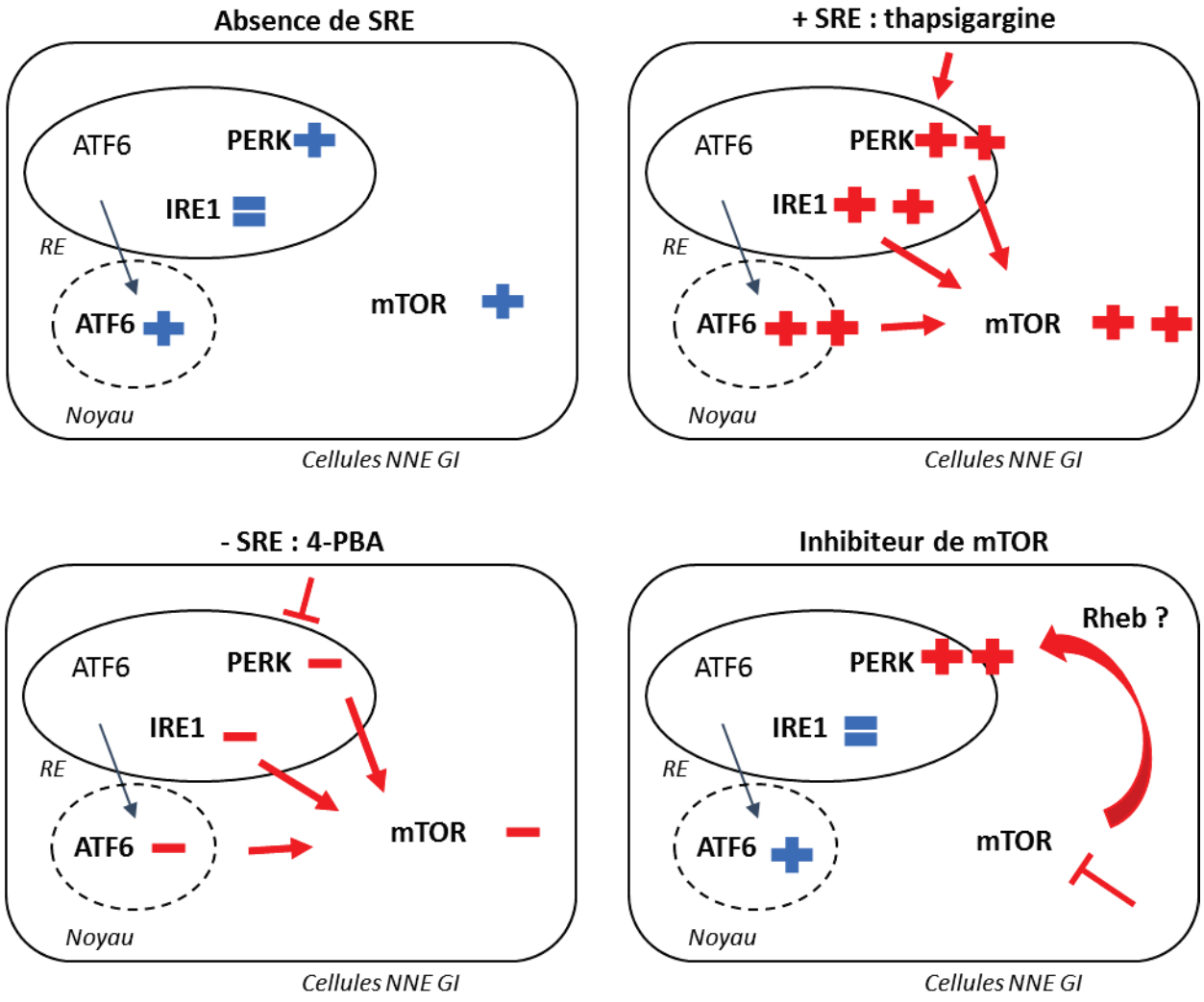


Figure 26 : Schéma récapitulatif de l'activation de l'UPR et de la voie mTOR dans les cellules des NNE GI.

Elle peut aussi être délétère en favorisant l'apoptose médiée par le SRE. Ainsi, la diminution de l'activation d'Akt suite au rétrocontrôle négatif de S6K1 sur IRS-1 active sélectivement la voie IRE1/JNK et induit l'apoptose dans les cellules tubulaires rénales NRK-52E (Kato et al. 2012; Bachar et al. 2009).

Dans les lignées cellulaires de NNE GI, nos résultats montrent que la voie mTORC1 est activée de façon concomitante à l'UPR lorsqu'un SRE est présent. En effet, nous démontrons que lors d'une déplétion en glucose, les voies PERK et ATF6 sont activées, ainsi que la voie mTORC1. En situation d'hypoxie, les trois voies de l'UPR PERK, ATF6 et IRE1 sont activées, tout comme mTORC1. Ces stress (déplétion énergétique et hypoxie) n'inhibent donc pas la voie mTORC1 dans les cellules de NNE GI, contrairement à ce qui est habituellement décrit dans d'autres lignées cellulaires (Laplante et Sabatini 2012). Ces résultats ont été confirmés sur les lignées de TNE pancréatiques INS-1E et RINm5F (article en cours de rédaction).

Lors d'une induction du SRE par la thapsigargine, l'UPR et la voie mTORC1 sont activés dans les cellules de NNE GI (Figure 26). Kato *et al.* ont démontré que le SRE induit par la thapsigargine entrainait l'activation de mTORC1 dans les cellules tubulaires rénales NRK-52E (Kato et al. 2012). Ils suggèrent que l'activation de mTORC1 provient de l'induction d'Akt par le SRE. A l'opposé, une autre étude a démontré que l'UPR était induit suite à l'activation constitutive de mTORC1 dans les cellules MEF (U. Ozcan et al. 2008). Dans les cellules de NNE GI, le traitement par le 4-PBA, un inhibiteur de l'UPR, diminue l'activation de la voie mTORC1. Ces résultats suggèrent que l'UPR contrôle l'état d'activation de la voie mTORC1 dans les cellules de NNE GI (Figure 26).

Afin de mieux comprendre l'interaction entre la voie mTORC1 et l'UPR, nous avons traité les cellules de NNE GI avec différents inhibiteurs de mTOR. Ozcan *et al.* démontre que le traitement des cellules par la rapamycine diminuait l'activation des voies PERK et IRE1 et l'expression de BiP dans les cellules MEF (U. Ozcan et al. 2008). L'étude de Kato *et al*. montre que la rapamycine diminue sélectivement l'activation de la voie IRE1. Contrairement à ces études, nos résultats montrent que les inhibiteurs de mTOR activent préférentiellement la voie PERK dans les lignées cellulaires STC-1 et GluTag (Figure 26). Les résultats de Tenkerian *et al.* montraient l'activation de la voie PERK/eIF2α suite au traitement par rapamycine des cellules MEF et des cellules de fibrosarcomes humains HT1080 (Tenkerian et al. 2015). Cette augmentation était indépendante de mTORC1 mais dépendait de l'inactivation de mTORC2 et favorisait la survie cellulaire. Dans les cellules STC-1, nous observons l'induction rapide de la voie PERK par la rapamycine, dès 20 minutes de traitement, lorsque la

rapamycine cible mTORC1. Cet effet est maintenu jusque 24 heures de traitement, temps pour lequel la rapamycine peut également inhiber mTORC2 (Dos D. Sarbassov et al. 2006). De plus, le traitement des cellules STC-1 avec les inhibiteurs compétitifs du site de liaison à l'ATP de mTORC1 et mTORC2, PP242 (M. E. Feldman et al. 2009) et WYE125132 (Yu et al. 2010) activent rapidement la voie PERK, ainsi que GSK2126458, inhibiteur de la PI3K et de mTORC1/C2 (Knight et al. 2010). Ces résultats ne nous permettent pas d'identifier quel complexe de mTOR est mis en jeu dans l'induction de la voie PERK. L'inhibition spécifique du complexe mTORC1 ou mTORC2, avec une technique utilisant des siARN ou shARN contre une protéine spécifique de chaque complexe, par exemple RAPTOR pour mTORC1 et RICTOR pour mTORC2, pourrait répondre à cette question. Un autre mécanisme a été proposé par Tyagi *et al*. : une nouvelle interaction entre Rheb et PERK consécutive à la perte d'interaction entre Rheb et mTORC1 (Tyagi et al. 2015). L'interaction entre PERK et Rheb dans les lignées cellulaires de NNE GI devra cependant être démontrée, par exemple à l'aide d'une technique de co-immunoprécipitation, pour des cellules traitées avec la rapamycine et non traitées.

Dans les cellules STC-1, l'activation de la voie PERK suite à l'inhibition de mTOR est en faveur de la survie cellulaire, car son inhibition pharmacologique diminue la viabilité des cellules STC-1 traitées par la rapamycine. Afin de confirmer ce résultat, nous avons généré un clone cellulaire STC-1 n'exprimant pas la protéine PERK, et nous l'avons soumis au traitement par la rapamycine. Nous observons une tendance à la diminution de la viabilité dans les cellules $PERK^{-/-}$ comparées aux cellules souches traitées par la rapamycine. Des expériences sont en cours afin de valider ce résultat. Il serait intéressant de voir si ce résultat se limite aux lignées cellulaires de NNE GI, ou s'il est observé dans les lignées de TNE pancréatiques. L'activation de la voie PERK suite aux traitements par inhibiteurs de mTOR pourrait constituer une voie de résistance aux inhibiteurs de mTOR. Nous nous sommes alors demandés si le développement métastatique dans le modèle murin de NNE GI était impacté par l'association d'un inhibiteur de mTOR et d'un inhibiteur de PERK. Nous avons co-traité les souris avec l'inhibiteur de mTOR évérolimus et l'inhibiteur de PERK GSK2656157. Deux posologies d'éverolimus ont été choisies. La posologie à 1,5 mg/kg/jour a démontré son important effet anti-tumoral dans le même modèle murin que notre étude (Bollard et al. 2013). Nous avons choisi une dose moitié moindre à 0,75 mg/kg/jour afin de mettre en évidence plus facilement une synergie d'action des deux molécules. Nos résultats ne montrent pas d'effet synergique de l'association GSK2656157/éverolimus, aux 2 posologies administrées. Néanmoins, compte-tenu du faible nombre de souris dans certains groupes, cette expérience doit être confirmée sur un plus grand nombre de souris. L'une des possibilités de cette absence d'effet synergique de l'association

peut être un effet encore trop puissant de l'évérolimus sur l'envahissement tumoral, même à la dose la plus faible, qui pourrait cacher l'effet synergique de l'association. De plus, les traitements ont été administrés au même moment, contrairement aux études *in vitro* où les cellules sont préalablement traitées avec l'inhibiteur de PERK. Un pré-traitement des souris avec l'inhibiteur de PERK, puis un traitement avec l'association pourraient être plus appropriés pour observer l'effet synergique.

La voie PERK est fortement activée lors du traitement par les inhibiteurs de mTOR. Afin d'étudier si cet effet existe lors du traitement par évérolimus chez l'homme, nous avons prévu d'étudier l'état d'activation des voies de l'UPR sur des échantillons tumoraux de patients atteints de NNE GI. Une série d'échantillons proviendra de patients non traités, et une seconde série proviendra de patients traités à l'éverolimus. Nous comparerons l'expression des marqueurs d'activation des 3 voies de l'UPR dans les 2 groupes de patients. Les résultats de cette expérience nous permettraient d'évaluer si le profil d'activation de l'UPR diffère entre les 2 groupes, et si l'on confirme l'activation de la voie PERK suite au traitement. Savoir si cette activation serait plutôt pro- ou anti-tumorale chez le patient reste un challenge, et nous ne pouvons répondre à cette question qu'à l'aide de modèle tumoraux reproduisant la tumeur humaine de manière imparfaite.

Pour poursuivre l'étude de l'interaction entre la voie mTOR et l'UPR au cours du traitement par évérolimus, nous pourrions également d'étudier le profil d'activation de l'UPR dans 3 séries de patients : les patients répondeurs, les patients non répondeurs et les patients avec échappement thérapeutique. Ceci permettrait d'évaluer s'il existe une corrélation entre le profil d'activation de l'UPR et la réponse au traitement. Ainsi, l'activation d'une ou plusieurs voies de l'UPR pourrait constituer un marqueur prédictif de réponse au traitement par inhibiteur de mTOR.

L'avènement des thérapies ciblées a permis une nouvelle prise en charge des TNE pancréatiques. La FDA a désormais étendu l'utilisation de l'évérolimus chez les patients atteints de TNE gastro-intestinales et pulmonaires, progressives et non fonctionnelles. Des études cliniques sont actuellement en cours afin d'évaluer l'efficacité de l'évérolimus dans les CNE. Il est nécessaire de développer des marqueurs prédictifs de réponses aux thérapies ciblées, pour sélectionner les patients « répondeurs » et ainsi privilégier un autre traitement pour les patients « non répondeurs ».

La mise en évidence du SRE dans les lignées de NNE GI, et l'implication de la voie PERK dans la survie cellulaire démontre l'intérêt de poursuivre l'étude du ciblage de l'UPR pour le traitement

des NNE GEP. Grâce au développement de petites molécules ciblant spécifiquement les voies de l'UPR, comme le GSK2656157, de nouvelles options thérapeutiques sont disponibles. Elles doivent cependant encore confirmer leurs effets anti-tumoraux chez l'homme. De plus, notre étude suggère l'existence d'un nouveau mécanisme de résistance aux thérapies ciblant mTOR, l'activation de la voie PERK. Si ces résultats se confirment au sein des NNE GEP humaines, ils permettront le développement de nouvelles associations thérapeutiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adachi, Yusuke, Keisuke Yamamoto, Tetsuya Okada, Hiderou Yoshida, Akihiro Harada, et Kazutoshi Mori. 2008. « ATF6 Is a Transcription Factor Specializing in the Regulation of Quality Control Proteins in the Endoplasmic Reticulum ». *Cell Structure and Function* 33 (1): 75-89. doi:10.1247/csf.07044.

Adams, R. L., I. P. Adams, S. W. Lindow, W. Zhong, et S. L. Atkin. 2005. « Somatostatin Receptors 2 and 5 Are Preferentially Expressed in Proliferating Endothelium ». *British Journal of Cancer* 92 (8): 1493-98. doi:10.1038/sj.bjc.6602503.

Agarwal, Sunita K. 2013. « Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 ». *Frontiers of Hormone Research* 41: 1-15. doi:10.1159/000345666.

Ahmadzadeh, Mojgan, Laura A. Johnson, Bianca Heemskerk, John R. Wunderlich, Mark E. Dudley, Donald E. White, et Steven A. Rosenberg. 2009. « Tumor Antigen-Specific CD8 T Cells Infiltrating the Tumor Express High Levels of PD-1 and Are Functionally Impaired ». *Blood* 114 (8): 1537-44. doi:10.1182/blood-2008-12-195792.

Ahn, H. K., J. Y. Choi, K.-M. Kim, H. Kim, S.-H. Choi, S. H. Park, J. O. Park, et al. 2013. « Phase II Study of Pazopanib Monotherapy in Metastatic Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumours ». *British Journal of Cancer* 109 (6): 1414-19. doi:10.1038/bjc.2013.470.

Alexandraki, Krystallenia I., et Gregory Kaltsas. 2012. « Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors: New Insights in the Diagnosis and Therapy ». *Endocrine* 41 (1): 40-52. doi:10.1007/s12020-011-9562-2.

Allen, Elizabeth, Pascal Miéville, Carmen M. Warren, Sadegh Saghafinia, Leanne Li, Mei-Wen Peng, et Douglas Hanahan. 2016. « Metabolic Symbiosis Enables Adaptive Resistance to Anti-Angiogenic Therapy That Is Dependent on mTOR Signaling ». *Cell Reports* 15 (6): 1144-60. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.029.

Ambler, G. R., A. A. Butler, J. Padmanabhan, B. H. Breier, et P. D. Gluckman. 1996. « The Effects of Octreotide on GH Receptor and IGF-I Expression in the GH-Deficient Rat ». *The Journal of Endocrinology* 149 (2): 223-31.

Ameri, Kurosh, et Adrian L. Harris. 2008. « Activating Transcription Factor 4 ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 (1): 14-21. doi:10.1016/j.biocel.2007.01.020.

Ameri, Kurosh, Claire E. Lewis, Martin Raida, Heidi Sowter, Tsonwin Hai, et Adrian L. Harris. 2004. « Anoxic Induction of ATF-4 through HIF-1-Independent Pathways of Protein Stabilization in Human Cancer Cells ». *Blood* 103 (5): 1876-82. doi:10.1182/blood-2003-06-1859.

Andruska, N., X. Zheng, X. Yang, W. G. Helferich, et D. J. Shapiro. 2015. « Anticipatory Estrogen Activation of the Unfolded Protein Response Is Linked to Cell Proliferation and Poor Survival in Estrogen Receptor α-Positive Breast Cancer ». *Oncogene* 34 (29): 3760-69. doi:10.1038/onc.2014.292.

Appenzeller-Herzog, Christian, et Michael N. Hall. 2012. « Bidirectional crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling ». *Trends in Cell Biology* 22 (5): 274-82. doi:10.1016/j.tcb.2012.02.006.

Arai, Masaaki, Nobuo Kondoh, Nobuo Imazeki, Akiyuki Hada, Kazuo Hatsuse, Fumihiro Kimura, Osamu Matsubara, Kazutoshi Mori, Toru Wakatsuki, et Mikio Yamamoto. 2006. « Transformation-Associated Gene Regulation by ATF6alpha during Hepatocarcinogenesis ». *FEBS Letters* 580 (1): 184-90. doi:10.1016/j.febslet.2005.11.072.

Araki, Eiichi, Seiichi Oyadomari, et Masataka Mori. 2003. « Impact of Endoplasmic Reticulum Stress Pathway on Pancreatic Beta-Cells and Diabetes Mellitus ». *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 228 (10): 1213-17.

Arap, Marco A., Johanna Lahdenranta, Paul J. Mintz, Amin Hajitou, Alvaro S. Sarkis, Wadih Arap, et Renata Pasqualini. 2004. « Cell Surface Expression of the Stress Response Chaperone GRP78 Enables Tumor Targeting by Circulating Ligands ». *Cancer Cell* 6 (3): 275-84. doi:10.1016/j.ccr.2004.08.018.

Arnold, Rudolf, Anja Rinke, Klaus-Jochen Klose, Hans-Helge Müller, Matthias Wied, Karin Zamzow, Christina Schmidt, et al. 2005. « Octreotide versus Octreotide plus Interferon-Alpha in Endocrine Gastroenteropancreatic Tumors: A Randomized Trial ». *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 3 (8): 761-71.

Atkins, Charity, Qi Liu, Elisabeth Minthorn, Shu-Yun Zhang, David J. Figueroa, Katherine Moss, Thomas B. Stanley, et al. 2013. « Characterization of a Novel PERK Kinase Inhibitor with Antitumor and Antiangiogenic Activity ». *Cancer Research* 73 (6): 1993-2002. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3109.

Auf, Gregor, Arnaud Jabouille, Sylvaine Guérit, Raphaël Pineau, Maylis Delugin, Marion Bouchecareilh, Noël Magnin, et al. 2010. « Inositol-Requiring Enzyme 1alpha Is a Key Regulator of Angiogenesis and Invasion in Malignant Glioma ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (35): 15553-58. doi:10.1073/pnas.0914072107.

Bachar, Etti, Yafa Ariav, Mali Ketzinel-Gilad, Erol Cerasi, Nurit Kaiser, et Gil Leibowitz. 2009. « Glucose Amplifies Fatty Acid-Induced Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic β-Cells via Activation of mTORC1 ». *PLoS ONE* 4 (3). doi:10.1371/journal.pone.0004954.

Banck, Michaela S., Rahul Kanwar, Amit A. Kulkarni, Ganesh K. Boora, Franziska Metge, Benjamin R. Kipp, Lizhi Zhang, et al. 2013. « The genomic landscape of small intestine neuroendocrine tumors ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (6): 2502-8. doi:10.1172/JCI67963.

Baudin, E., A. Gigliotti, M. Ducreux, J. Ropers, E. Comoy, J. C. Sabourin, J. M. Bidart, et al. 1998. « Neuron-Specific Enolase and Chromogranin A as Markers of Neuroendocrine Tumours ». *British Journal of Cancer* 78 (8): 1102-7.

Bauer, W., U. Briner, W. Doepfner, R. Haller, R. Huguenin, P. Marbach, T. J. Petcher, et null Pless. 1982. « SMS 201-995: A Very Potent and Selective Octapeptide Analogue of Somatostatin with Prolonged Action ». *Life Sciences* 31 (11): 1133-40.

Baum, Richard P, Ameya D Puranik, et Harshad R Kulkarni. 2015. « Peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) of neuroendocrine tumors: current state and future perspectives ». *International Journal of Endocrine Oncology* 2 (2): 151-58. doi:10.2217/ije.15.5.

Bertolotti, A., Y. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding, et D. Ron. 2000. « Dynamic Interaction of BiP and ER Stress Transducers in the Unfolded-Protein Response ». *Nature Cell Biology* 2 (6): 326-32. doi:10.1038/35014014.

Bi, Meixia, Christine Naczki, Marianne Koritzinsky, Diane Fels, Jaime Blais, Nianping Hu, Heather Harding, et al. 2005. « ER Stress-Regulated Translation Increases Tolerance to Extreme Hypoxia and Promotes Tumor Growth ». *The EMBO Journal* 24 (19): 3470-81. doi:10.1038/sj.emboj.7600777.

Blais, Jaime D., Vasilisa Filipenko, Meixia Bi, Heather P. Harding, David Ron, Costas Koumenis, Bradly G. Wouters, et John C. Bell. 2004. « Activating Transcription Factor 4 Is Translationally

Regulated by Hypoxic Stress ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (17): 7469-82. doi:10.1128/MCB.24.17.7469-7482.2004.

Boado, R. J., et W. M. Pardridge. 1993. « Glucose Deprivation Causes Posttranscriptional Enhancement of Brain Capillary Endothelial Glucose Transporter Gene Expression via GLUT1 mRNA Stabilization ». *Journal of Neurochemistry* 60 (6): 2290-96.

Bobrovnikova-Marjon, Ekaterina, Christina Grigoriadou, Dariusz Pytel, Fang Zhang, Jiangbin Ye, Constantinos Koumenis, Douglas Cavener, et J. Alan Diehl. 2010. « PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage ». *Oncogene* 29 (27): 3881-95. doi:10.1038/onc.2010.153.

Bollard, Julien, Christophe Couderc, Martine Blanc, Gilles Poncet, Florian Lepinasse, Valérie Hervieu, Géraldine Gouysse, et al. 2013. « Antitumor Effect of Everolimus in Preclinical Models of High-Grade Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Carcinomas ». *Neuroendocrinology* 97 (4): 331-40. doi:10.1159/000347063.

Boulbes, Delphine, Tattym Shaiken, et Dos D. Sarbassov. 2011. « Endoplasmic reticulum is a main localization site of mTORC2 ». *Biochemical and biophysical research communications* 413 (1): 46-52. doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.034.

Boyce, Michael, Kevin F. Bryant, Céline Jousse, Kai Long, Heather P. Harding, Donalyn Scheuner, Randal J. Kaufman, et al. 2005. « A Selective Inhibitor of eIF2alpha Dephosphorylation Protects Cells from ER Stress ». *Science (New York, N.Y.)* 307 (5711): 935-39. doi:10.1126/science.1101902.

Brandi, M. L., R. F. Gagel, A. Angeli, J. P. Bilezikian, P. Beck-Peccoz, C. Bordi, B. Conte-Devolx, et al. 2001. « Guidelines for Diagnosis and Therapy of MEN Type 1 and Type 2 ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86 (12): 5658-71. doi:10.1210/jcem.86.12.8070.

Brazeau, P., W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier, et R. Guillemin. 1973. « Hypothalamic Polypeptide That Inhibits the Secretion of Immunoreactive Pituitary Growth Hormone ». *Science (New York, N.Y.)* 179 (4068): 77-79.

Brizel, D. M., G. S. Sibley, L. R. Prosnitz, R. L. Scher, et M. W. Dewhirst. 1997. « Tumor Hypoxia Adversely Affects the Prognosis of Carcinoma of the Head and Neck ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 38 (2): 285-89.

Brugarolas, James B., Francisca Vazquez, Archana Reddy, William R. Sellers, et William G. Kaelin. 2003. « TSC2 Regulates VEGF through mTOR-Dependent and -Independent Pathways ». *Cancer Cell* 4 (2): 147-58.

Calfon, Marcella, Huiqing Zeng, Fumihiko Urano, Jeffery H. Till, Stevan R. Hubbard, Heather P. Harding, Scott G. Clark, et David Ron. 2002. « IRE1 Couples Endoplasmic Reticulum Load to Secretory Capacity by Processing the XBP-1 mRNA ». *Nature* 415 (6867): 92-96. doi:10.1038/415092a.

Cantor, Jason R., et David M. Sabatini. 2012. « Cancer Cell Metabolism: One Hallmark, Many Faces ». *Cancer Discovery* 2 (10): 881-98. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0345.

Carling, Tobias. 2005. « Multiple Endocrine Neoplasia Syndrome: Genetic Basis for Clinical Management ». *Current Opinion in Oncology* 17 (1): 7-12.

Carracedo, Arkaitz, Li Ma, Julie Teruya-Feldstein, Federico Rojo, Leonardo Salmena, Andrea Alimonti, Ainara Egia, et al. 2008. « Inhibition of mTORC1 Leads to MAPK Pathway Activation through a PI3K-Dependent Feedback Loop in Human Cancer ». *The Journal of Clinical Investigation* 118 (9): 3065-74. doi:10.1172/JCI34739.

Carrasco, Daniel R., Kumar Sukhdeo, Marina Protopopova, Raktim Sinha, Miriam Enos, Daniel E. Carrasco, Mei Zheng, et al. 2007. « The Differentiation and Stress Response Factor XBP-1 Drives Multiple Myeloma Pathogenesis ». *Cancer Cell* 11 (4): 349-60. doi:10.1016/j.ccr.2007.02.015.

Castellano, Daniel, Jaume Capdevila, Javier Sastre, Vicente Alonso, Marta Llanos, Rocío García-Carbonero, José Luis Manzano Mozo, Isabel Sevilla, Ignacio Durán, et Ramón Salazar. 2013. « Sorafenib and Bevacizumab Combination Targeted Therapy in Advanced Neuroendocrine Tumour: A Phase II Study of Spanish Neuroendocrine Tumour Group (GETNE0801) ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 49 (18): 3780-87. doi:10.1016/j.ejca.2013.06.042.

Catena, Laura, Emilio Bajetta, Massimo Milione, Monika Ducceschi, Monica Valente, Francesca Dominoni, et Valentina Colonna. 2011. « Mammalian Target of Rapamycin Expression in Poorly Differentiated Endocrine Carcinoma: Clinical and Therapeutic Future Challenges ». *Targeted Oncology* 6 (2): 65-68. doi:10.1007/s11523-011-0171-z.

Chan, Jeng Yie, Jude Luzuriaga, Emma L. Maxwell, Phillip K. West, Mohammed Bensellam, et D. Ross Laybutt. 2015. « The Balance between Adaptive and Apoptotic Unfolded Protein Responses Regulates β-Cell Death under ER Stress Conditions through XBP1, CHOP and JNK ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 413 (septembre): 189-201. doi:10.1016/j.mce.2015.06.025.

Chan, Jennifer A., Robert J. Mayer, Nadine Jackson, Paige Malinowski, Eileen Regan, et Matthew H. Kulke. 2013. « Phase I Study of Sorafenib in Combination with Everolimus (RAD001) in Patients with Advanced Neuroendocrine Tumors ». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 71 (5): 1241-46. doi:10.1007/s00280-013-2118-9.

Chandrasekharappa, S. C., S. C. Guru, P. Manickam, S. E. Olufemi, F. S. Collins, M. R. Emmert-Buck, L. V. Debelenko, et al. 1997. « Positional Cloning of the Gene for Multiple Endocrine Neoplasia-Type 1 ». *Science (New York, N.Y.)* 276 (5311): 404-7.

« Characteristics, prognosis and treatments of 294 patients with poorly differentiated neuroendocrine carcinoma: The FFCD-GTE national cohort. » 2016. *Journal of Clinical Oncology*. Consulté le juillet 15. http://meetinglibrary.asco.org/content/147906-156.

Chen, Chien-Hung, Tattym Shaikenov, Timothy R. Peterson, Rakhan Aimbetov, Amangeldy K. Bissenbaev, Szu-Wei Lee, Juan Wu, Hui-Kuan Lin, et Dos D. Sarbassov. 2011. « ER Stress Inhibits mTORC2 and Akt Signaling through GSK-3β-Mediated Phosphorylation of Rictor ». *Science Signaling* 4 (161): ra10. doi:10.1126/scisignal.2001731.

Chen, Hui, et Ling Qi. 2010. « SUMO Modification Regulates the Transcriptional Activity of XBP1 ». *Biochemical Journal* 429 (1): 95-102. doi:10.1042/BJ20100193.

Chen, Xi, Dimitrios Iliopoulos, Qing Zhang, Qianzi Tang, Matthew B. Greenblatt, Maria Hatziapostolou, Elgene Lim, et al. 2014. « XBP1 Promotes Triple Negative Breast Cancer By Controlling the HIF1 α Pathway ». *Nature* 508 (7494): 103-7. doi:10.1038/nature13119.

Chen, Xi, Jingshi Shen, et Ron Prywes. 2002. « The Luminal Domain of ATF6 Senses Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Causes Translocation of ATF6 from the ER to the Golgi ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (15): 13045-52. doi:10.1074/jbc.M110636200.

Chevet, Eric, Claudio Hetz, et Afshin Samali. 2015. « Endoplasmic Reticulum Stress-Activated Cell Reprogramming in Oncogenesis ». *Cancer Discovery* 5 (6): 586-97. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-1490.

Chou, Wen-Chi, Jen-Shi Chen, Yu-Shin Hung, Jun-Te Hsu, Tse-Ching Chen, Chien-Feng Sun, Chang-Hsien Lu, et Tsann-Long Hwang. 2014. « Plasma Chromogranin A Levels Predict Survival and

Tumor Response in Patients with Advanced Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors ». *Anticancer Research* 34 (10): 5661-69.

Connor, J. H., D. C. Weiser, S. Li, J. M. Hallenbeck, et S. Shenolikar. 2001. « Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein GADD34 Assembles a Novel Signaling Complex Containing Protein Phosphatase 1 and Inhibitor 1 ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (20): 6841-50. doi:10.1128/MCB.21.20.6841-6850.2001.

Cortez, Leonardo, et Valerie Sim. 2014. « The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases ». *Prion* 8 (2): 197-202. doi:10.4161/pri.28938.

Couderc, Christophe, Gilles Poncet, Karine Villaume, Martine Blanc, Nicolas Gadot, Thomas Walter, Florian Lepinasse, et al. 2011. « Targeting the PI3K/mTOR Pathway in Murine Endocrine Cell Lines ». *The American Journal of Pathology* 178 (1): 336-44. doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.023.

Couvelard, A, D O'Toole, H Turley, R Leek, A Sauvanet, C Degott, P Ruszniewski, et al. 2005. « Microvascular density and hypoxia-inducible factor pathway in pancreatic endocrine tumours: negative correlation of microvascular density and VEGF expression with tumour progression ». *British Journal of Cancer* 92 (1): 94-101. doi:10.1038/sj.bjc.6602245.

Couvelard, Anne, Lydia Deschamps, Vinciane Rebours, Alain Sauvanet, Kevin Gatter, Francesco Pezzella, Philippe Ruszniewski, et Pierre Bedossa. 2008. « Overexpression of the Oxygen Sensors PHD-1, PHD-2, PHD-3, and FIH Is Associated with Tumor Aggressiveness in Pancreatic Endocrine Tumors ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 14 (20): 6634-39. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5258.

Cox, J. S., C. E. Shamu, et P. Walter. 1993. « Transcriptional Induction of Genes Encoding Endoplasmic Reticulum Resident Proteins Requires a Transmembrane Protein Kinase ». *Cell* 73 (6): 1197-1206.

Crona, Joakim, et Britt Skogseid. 2016. « GEP- NETS UPDATE: Genetics of Neuroendocrine Tumors ». *European Journal of Endocrinology* 174 (6): R275-290. doi:10.1530/EJE-15-0972.

Cullinan, Sara B., et J. Alan Diehl. 2004. « PERK-Dependent Activation of Nrf2 Contributes to Redox Homeostasis and Cell Survival Following Endoplasmic Reticulum Stress ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (19): 20108-17. doi:10.1074/jbc.M314219200.

Cullinan, Sara B., Donna Zhang, Mark Hannink, Edward Arvisais, Randal J. Kaufman, et J. Alan Diehl. 2003. « Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (20): 7198-7209.

Dalton, L E, H J Clarke, J Knight, M H Lawson, J Wason, D A Lomas, W J Howat, R C Rintoul, D M Rassl, et S J Marciniak. 2013. « The endoplasmic reticulum stress marker CHOP predicts survival in malignant mesothelioma ». *British Journal of Cancer* 108 (6): 1340-47. doi:10.1038/bjc.2013.66.

Davies, Michael P. A., Dong Liu Barraclough, Ceri Stewart, Kathryn A. Joyce, Richard M. Eccles, Roger Barraclough, Philip S. Rudland, et David Ross Sibson. 2008. « Expression and Splicing of the Unfolded Protein Response Gene XBP-1 Are Significantly Associated with Clinical Outcome of Endocrine-Treated Breast Cancer ». *International Journal of Cancer* 123 (1): 85-88. doi:10.1002/ijc.23479.

Dejeans, Nicolas, Kim Barroso, Martin E. Fernandez-Zapico, Afshin Samali, et Eric Chevet. 2015. « Novel Roles of the Unfolded Protein Response in the Control of Tumor Development and Aggressiveness ». *Seminars in Cancer Biology* 33 (août): 67-73. doi:10.1016/j.semcancer.2015.04.007.

DeLellis, Ronald A., International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, International Academy of Pathology, et International Association for the Study of Lung Cancer, éd. 2004. *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press.

Delépine, M., M. Nicolino, T. Barrett, M. Golamaully, G. M. Lathrop, et C. Julier. 2000. « EIF2AK3, Encoding Translation Initiation Factor 2-Alpha Kinase 3, Is Mutated in Patients with Wolcott-Rallison Syndrome ». *Nature Genetics* 25 (4): 406-9. doi:10.1038/78085.

Denoyelle, Christophe, George Abou-Rjaily, Vladimir Bezrookove, Monique Verhaegen, Timothy M. Johnson, Douglas R. Fullen, Jenny N. Pointer, et al. 2006. « Anti-Oncogenic Role of the Endoplasmic Reticulum Differentially Activated by Mutations in the MAPK Pathway ». *Nature Cell Biology* 8 (10): 1053-63. doi:10.1038/ncb1471.

DeStefano, Michael A., et Estela Jacinto. 2013. « Regulation of insulin receptor substrate-1 by mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) ». *Biochemical Society transactions* 41 (4): 896-901. doi:10.1042/BST20130018.

Detjen, K. M., M. Welzel, K. Farwig, F. H. Brembeck, A. Kaiser, E. O. Riecken, B. Wiedenmann, et S. Rosewicz. 2000. « Molecular Mechanism of Interferon Alfa-Mediated Growth Inhibition in Human Neuroendocrine Tumor Cells ». *Gastroenterology* 118 (4): 735-48.

Di Nardo, Alessia, Ioannis Kramvis, Namjik Cho, Abbey Sadowski, Lynsey Meikle, David J. Kwiatkowski, et Mustafa Sahin. 2009. « Tuberous Sclerosis Complex Activity is Required to Control Neuronal Stress Responses in an mTOR-Dependent Manner ». *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (18): 5926-37. doi:10.1523/JNEUROSCI.0778-09.2009.

Dominguez, S., A. Denys, I. Madeira, P. Hammel, V. Vilgrain, Y. Menu, P. Bernades, et P. Ruszniewski. 2000. « Hepatic Arterial Chemoembolization with Streptozotocin in Patients with Metastatic Digestive Endocrine Tumours ». *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 12 (2): 151-57.

Dong, Dezheng, Min Ni, Jianze Li, Shigang Xiong, Wei Ye, Jenilyn J. Virrey, Changhui Mao, et al. 2008. « Critical Role of the Stress Chaperone GRP78/BiP in Tumor Proliferation, Survival, and Tumor Angiogenesis in Transgene-Induced Mammary Tumor Development ». *Cancer Research* 68 (2): 498-505. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2950.

Dong, Dezheng, Christopher Stapleton, Biquan Luo, Shigang Xiong, Wei Ye, Yi Zhang, Niyati Jhaveri, et al. 2011. « A Critical Role for GRP78/BiP in the Tumor Microenvironment for Neovascularization during Tumor Growth and Metastasis ». *Cancer Research* 71 (8): 2848-57. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3151.

Donis-Keller, H., S. Dou, D. Chi, K. M. Carlson, K. Toshima, T. C. Lairmore, J. R. Howe, J. F. Moley, P. Goodfellow, et S. A. Wells. 1993. « Mutations in the RET Proto-Oncogene Are Associated with MEN 2A and FMTC ». *Human Molecular Genetics* 2 (7): 851-56.

Dorton, A. M. 2000. « The Pituitary Gland: Embryology, Physiology, and Pathophysiology ». *Neonatal Network: NN* 19 (2): 9-17. doi:10.1891/0730-0832.19.2.9.

Drucker, D. J., T. Jin, S. L. Asa, T. A. Young, et P. L. Brubaker. 1994. « Activation of Proglucagon Gene Transcription by Protein Kinase-A in a Novel Mouse Enteroendocrine Cell Line ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 8 (12): 1646-55. doi:10.1210/mend.8.12.7535893.

Ducreux, Michel, Laetitia Dahan, Denis Smith, Dermot O'Toole, Céline Lepère, Clarisse Dromain, Valérie Vilgrain, et al. 2014. « Bevacizumab Combined with 5-FU/Streptozocin in Patients with Progressive Metastatic Well-Differentiated Pancreatic Endocrine Tumours (BETTER

Trial)--a Phase II Non-Randomised Trial ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 50 (18): 3098-3106. doi:10.1016/j.ejca.2014.10.002.

Duran, I., J. Kortmansky, D. Singh, H. Hirte, W. Kocha, G. Goss, L. Le, et al. 2006. « A Phase II Clinical and Pharmacodynamic Study of Temsirolimus in Advanced Neuroendocrine Carcinomas ». *British Journal of Cancer* 95 (9): 1148-54. doi:10.1038/sj.bjc.6603419.

Eriksson, B., et K. Öberg. 1999. « Summing up 15 years of somatostatin analog therapy in neuroendocrine tumors: Future outlook ». *Annals of Oncology* 10 (suppl_2): S31-38. doi:10.1093/annonc/10.suppl_2.S31.

Faiss, Siegbert, Ulrich-Frank Pape, Michael Böhmig, Yvonne Dörffel, Ulrich Mansmann, Werner Golder, Ernst Otto Riecken, Bertram Wiedenmann, et International Lanreotide and Interferon Alfa Study Group. 2003. « Prospective, Randomized, Multicenter Trial on the Antiproliferative Effect of Lanreotide, Interferon Alfa, and Their Combination for Therapy of Metastatic Neuroendocrine Gastroenteropancreatic Tumors--the International Lanreotide and Interferon Alfa Study Group ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (14): 2689-96. doi:10.1200/JCO.2003.12.142.

Faivre, S., P. Niccoli, D. Castellano, J. W. Valle, P. Hammel, J.-L. Raoul, A. Vinik, et al. 2016. « Sunitinib in Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Updated Progression-Free Survival and Final Overall Survival From a Phase III Randomized Study ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, novembre. doi:10.1093/annonc/mdw561.

Fan, Yangwei, Ke Ma, Chuying Wang, Jing Ning, Yuan Hu, Danfeng Dong, Xuyuan Dong, Qianqian Geng, Enxiao Li, et Yinying Wu. 2016. « Prognostic Value of PD-L1 and PD-1 Expression in Pulmonary Neuroendocrine Tumors ». *OncoTargets and Therapy* 9: 6075-82. doi:10.2147/OTT.S115054.

Farlie, Peter G., Sonja J. McKeown, et Donald F. Newgreen. 2004. « The Neural Crest: Basic Biology and Clinical Relationships in the Craniofacial and Enteric Nervous Systems ». *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 72 (2): 173-89. doi:10.1002/bdrc.20013.

Fazio, Nicola. 2015. « Neuroendocrine tumors resistant to mammalian target of rapamycin inhibitors: A difficult conversion from biology to the clinic ». *World Journal of Clinical Oncology* 6 (6): 194-97. doi:10.5306/wjco.v6.i6.194.

Feldman, Douglas E., Vibha Chauhan, et Albert C. Koong. 2005. « The Unfolded Protein Response: A Novel Component of the Hypoxic Stress Response in Tumors ». *Molecular Cancer Research: MCR* 3 (11): 597-605. doi:10.1158/1541-7786.MCR-05-0221.

Feldman, Morris E., Beth Apsel, Aino Uotila, Robbie Loewith, Zachary A. Knight, Davide Ruggero, et Kevan M. Shokat. 2009. « Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-Resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2 ». *PLoS Biology* 7 (2): e38. doi:10.1371/journal.pbio.1000038.

Feldman, Steven A., et Lee E. Eiden. 2003. « The Chromogranins: Their Roles in Secretion from Neuroendocrine Cells and as Markers for Neuroendocrine Neoplasia ». *Endocrine Pathology* 14 (1): 3-23.

Fels, Diane R., et Constantinos Koumenis. 2006. « The PERK/eIF2alpha/ATF4 Module of the UPR in Hypoxia Resistance and Tumor Growth ». *Cancer Biology & Therapy* 5 (7): 723-28.

Fendrich, Volker, Katja Maschuw, Johannes Rehm, Malte Buchholz, Julia P. Holler, Emily P. Slater, Detlef K. Bartsch, et Jens Waldmann. 2012. « Sorafenib Inhibits Tumor Growth and Improves Survival in a Transgenic Mouse Model of Pancreatic Islet Cell Tumors ». *The Scientific World Journal* 2012 (décembre). doi:10.1100/2012/529151.

Feng, Daorong, Jianwen Wei, Sounak Gupta, Barbara C. McGrath, et Douglas R. Cavener. 2009. « Acute Ablation of PERK Results in ER Dysfunctions Followed by Reduced Insulin Secretion and Cell Proliferation ». *BMC Cell Biology* 10: 61. doi:10.1186/1471-2121-10-61.

Feng, Zhaohui, Wenwei Hu, Elisa de Stanchina, Angelika K. Teresky, Shengkan Jin, Scott Lowe, et Arnold J. Levine. 2007. « The Regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN Expression by p53: Stress, Cell and Tissue Specificity, and the Role of These Gene Products in Modulating the IGF-1-AKT-mTOR Pathways ». *Cancer Research* 67 (7): 3043-53. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4149.

Florio, T., S. Thellung, S. Arena, A. Corsaro, A. Bajetto, G. Schettini, et P. J. Stork. 2000. « Somatostatin Receptor 1 (SSTR1)-Mediated Inhibition of Cell Proliferation Correlates with the Activation of the MAP Kinase Cascade: Role of the Phosphotyrosine Phosphatase SHP-2 ». *Journal of Physiology, Paris* 94 (3-4): 239-50.

Folkman, Judah. 2002. « Role of Angiogenesis in Tumor Growth and Metastasis ». *Seminars in Oncology* 29 (6 Suppl 16): 15-18. doi:10.1053/sonc.2002.37263.

Fraenkel, M., M. Kim, A. Faggiano, W. W. de Herder, G. D. Valk, et Knowledge NETwork. 2014. « Incidence of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumours: A Systematic Review of the Literature ». *Endocrine-Related Cancer* 21 (3): R153-163. doi:10.1530/ERC-13-0125.

Francis, Joshua M., Adam Kiezun, Alex H. Ramos, Stefano Serra, Chandra Sekhar Pedamallu, Zhi Rong Qian, Michaela S. Banck, et al. 2013. « Somatic Mutation of CDKN1B in Small Intestine Neuroendocrine Tumors ». *Nature Genetics* 45 (12): 1483-86. doi:10.1038/ng.2821.

Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, et al. 2000. « Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation ». *The Journal of Experimental Medicine* 192 (7): 1027-34.

Freis, Patricia, Emmanuelle Graillot, Pascal Rousset, Valérie Hervieu, Laurence Chardon, Catherine Lombard-Bohas, et Thomas Walter. 2017. « Prognostic Factors in Neuroendocrine Carcinoma: Biological Markers Are More Useful than Histomorphological Markers ». *Scientific Reports* 7 (janvier): 40609. doi:10.1038/srep40609.

Gambella, Manuela, Alberto Rocci, Roberto Passera, Francesca Gay, Paola Omedè, Claudia Crippa, Paolo Corradini, et al. 2014. « High XBP1 Expression Is a Marker of Better Outcome in Multiple Myeloma Patients Treated with Bortezomib ». *Haematologica* 99 (2): e14-16. doi:10.3324/haematol.2013.090142.

García-Martínez, Juan M., et Dario R. Alessi. 2008. « mTOR Complex 2 (mTORC2) Controls Hydrophobic Motif Phosphorylation and Activation of Serum- and Glucocorticoid-Induced Protein Kinase 1 (SGK1) ». *The Biochemical Journal* 416 (3): 375-85. doi:10.1042/BJ20081668.

Gardner, Brooke M., et Peter Walter. 2011. « Unfolded Proteins Are Ire1-Activating Ligands That Directly Induce the Unfolded Protein Response ». *Science (New York, N.Y.)* 333 (6051): 1891-94. doi:10.1126/science.1209126.

Gatenby, R. A., H. B. Kessler, J. S. Rosenblum, L. R. Coia, P. J. Moldofsky, W. H. Hartz, et G. J. Broder. 1988. « Oxygen Distribution in Squamous Cell Carcinoma Metastases and Its Relationship to Outcome of Radiation Therapy ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 14 (5): 831-38.

Gradwohl, Gérard, Andrée Dierich, Marianne LeMeur, et François Guillemot. 2000. « neurogenin3 Is Required for the Development of the Four Endocrine Cell Lineages of the Pancreas ».

Proceedings of the National Academy of Sciences 97 (4): 1607-11. doi:10.1073/pnas.97.4.1607.

Grande, E., J. Capdevila, D. Castellano, A. Teulé, I. Durán, J. Fuster, I. Sevilla, et al. 2015. « Pazopanib in Pretreated Advanced Neuroendocrine Tumors: A Phase II, Open-Label Trial of the Spanish Task Force Group for Neuroendocrine Tumors (GETNE) ». *Annals of Oncology* 26 (9): 1987-93. doi:10.1093/annonc/mdv252.

Greenman, Christopher, Philip Stephens, Raffaella Smith, Gillian L. Dalgliesh, Christopher Hunter, Graham Bignell, Helen Davies, et al. 2007. « Patterns of Somatic Mutation in Human Cancer Genomes ». *Nature* 446 (7132): 153-58. doi:10.1038/nature05610.

Griffiths, D. F. R., G. T. Williams, et E. D. Williams. 1987. « Duodenal Carcinoid Tumours, Phaeochromocytoma and Neurofibromatosis: Islet Cell Tumour, Phaeochromocytoma and the Von Hippel-Lindau Complex: Two Distinctive Neuroendocrine Syndromes ». *QJM: An International Journal of Medicine* 64 (3): 769-82. doi:10.1093/oxfordjournals.qjmed.a068147.

Gu, Yuan, Claudia Scheuer, Dilu Feng, Michael D. Menger, et Matthias W. Laschke. 2013. « Inhibition of Angiogenesis: A Novel Antitumor Mechanism of the Herbal Compound Arctigenin ». *Anti-Cancer Drugs* 24 (8): 781-91. doi:10.1097/CAD.0b013e328362fb84.

Gupta, Sounak, Barbara McGrath, et Douglas R. Cavener. 2009. « PERK Regulates the Proliferation and Development of Insulin-Secreting Beta-Cell Tumors in the Endocrine Pancreas of Mice ». *PLoS ONE* 4 (11). doi:10.1371/journal.pone.0008008.

Gwinn, Dana M., David B. Shackelford, Daniel F. Egan, Maria M. Mihaylova, Annabelle Mery, Debbie S. Vasquez, Benjamin E. Turk, et Reuben J. Shaw. 2008. « AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint ». *Molecular Cell* 30 (2): 214-26. doi:10.1016/j.molcel.2008.03.003.

Halliday, M., H. Radford, Y. Sekine, J. Moreno, N. Verity, J. le Quesne, C. A. Ortori, et al. 2015. « Partial Restoration of Protein Synthesis Rates by the Small Molecule ISRIB Prevents Neurodegeneration without Pancreatic Toxicity ». *Cell Death & Disease* 6 (mars): e1672. doi:10.1038/cddis.2015.49.

Han, Dan, Alana G. Lerner, Lieselotte Vande Walle, John-Paul Upton, Weihong Xu, Andrew Hagen, Bradley J. Backes, Scott A. Oakes, et Feroz R. Papa. 2009. « IRE1alpha Kinase Activation Modes Control Alternate Endoribonuclease Outputs to Determine Divergent Cell Fates ». *Cell* 138 (3): 562-75. doi:10.1016/j.cell.2009.07.017.

Harding, H. P., H. Zeng, Y. Zhang, R. Jungries, P. Chung, H. Plesken, D. D. Sabatini, et D. Ron. 2001. « Diabetes Mellitus and Exocrine Pancreatic Dysfunction in Perk-/- Mice Reveals a Role for Translational Control in Secretory Cell Survival ». *Molecular Cell* 7 (6): 1153-63.

Harg, J. M. van der, A. Nölle, R. Zwart, A. S. Boerema, E. S. van Haastert, A. M. Strijkstra, J. Jm Hoozemans, et W. Scheper. 2014. « The Unfolded Protein Response Mediates Reversible Tau Phosphorylation Induced by Metabolic Stress ». *Cell Death & Disease* 5 (8): e1393. doi:10.1038/cddis.2014.354.

Hartley, Taila, Madura Siva, Elida Lai, Tracy Teodoro, Liling Zhang, et Allen Volchuk. 2010. « Endoplasmic reticulum stress response in an INS-1 pancreatic β-cell line with inducible expression of a folding-deficient proinsulin ». *BMC Cell Biology* 11 (juillet): 59. doi:10.1186/1471-2121-11-59.

Haruta, Tetsuro, Tatsuhito Uno, Junko Kawahara, Atsuko Takano, Katsuya Egawa, Prem M. Sharma, Jerrold M. Olefsky, et Masashi Kobayashi. 2000. « A Rapamycin-Sensitive Pathway Down-

Regulates Insulin Signaling via Phosphorylation and Proteasomal Degradation of Insulin Receptor Substrate-1 ». *Molecular Endocrinology* 14 (6): 783-94. doi:10.1210/mend.14.6.0446.

Hassler, Justin, Stewart S. Cao, et Randal J. Kaufman. 2012. « IRE1, a Double-Edged Sword in Pre-miRNA Slicing and Cell Death ». *Developmental Cell* 23 (5): 921-23. doi:10.1016/j.devcel.2012.10.025.

Hassler, Justin R., Donalyn L. Scheuner, Shiyu Wang, Jaeseok Han, Vamsi K. Kodali, Philip Li, Julie Nguyen, et al. 2015. « The IRE1α/XBP1s Pathway Is Essential for the Glucose Response and Protection of β Cells ». *PLoS Biology* 13 (10): e1002277. doi:10.1371/journal.pbio.1002277.

Hauso, Oyvind, Bjorn I. Gustafsson, Mark Kidd, Helge L. Waldum, Ignat Drozdov, Anthony K. C. Chan, et Irvin M. Modlin. 2008. « Neuroendocrine Tumor Epidemiology: Contrasting Norway and North America ». *Cancer* 113 (10): 2655-64. doi:10.1002/cncr.23883.

Haze, Kyosuke, Hiderou Yoshida, Hideki Yanagi, Takashi Yura, et Kazutoshi Mori. 1999. « Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress ». *Molecular Biology of the Cell* 10 (11): 3787-99.

He, Yong, Arlene M. Correa, Maria Gabriela Raso, Wayne L. Hofstetter, Bingliang Fang, Carmen Behrens, Jack A. Roth, et al. 2011. « The Role of PKR/eIF2α Signaling Pathway in Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer ». *PLoS ONE* 6 (11). doi:10.1371/journal.pone.0024855.

Heetfeld, M., C. N. Chougnet, I. H. Olsen, A. Rinke, I. Borbath, G. Crespo, J. Barriuso, et al. 2015. « Characteristics and Treatment of Patients with G3 Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms ». *Endocrine-Related Cancer* 22 (4): 657-64. doi:10.1530/ERC-15-0119.

Heetfeld, Maximilian, Atsuko Kasajima, Arend Koch, Francesco Milone, Ingo Steffen, Manfred Dietel, Hironobu Sasano, Bertram Wiedenmann, et Marianne E. Pavel. 2013. « Poorly differentiated neuroendocrine carcinoma (NEC G3): Prognostic factors and potential novel targets. » *ASCO Meeting Abstracts* 31 (15_suppl): e15071.

Higa, Arisa, Said Taouji, Stéphanie Lhomond, Devon Jensen, Martin E. Fernandez-Zapico, Jeremy C. Simpson, Jean-Max Pasquet, Randy Schekman, et Eric Chevet. 2014. « Endoplasmic Reticulum Stress-Activated Transcription Factor ATF6α Requires the Disulfide Isomerase PDIA5 to Modulate Chemoresistance ». *Molecular and Cellular Biology* 34 (10): 1839-49. doi:10.1128/MCB.01484-13.

Hitomi, Junichi, Taiichi Katayama, Yutaka Eguchi, Takashi Kudo, Manabu Taniguchi, Yoshihisa Koyama, Takayuki Manabe, et al. 2004. « Involvement of Caspase-4 in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Abeta-Induced Cell Death ». *The Journal of Cell Biology* 165 (3): 347-56. doi:10.1083/jcb.200310015.

Höckel, M., et P. Vaupel. 2001. « Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects ». *Journal of the National Cancer Institute* 93 (4): 266-76.

Hofland, L. J., et S. W. Lamberts. 2001. « Somatostatin Receptor Subtype Expression in Human Tumors ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 12 Suppl 2: S31-36.

Hollien, Julie, Jonathan H. Lin, Han Li, Nicole Stevens, Peter Walter, et Jonathan S. Weissman. 2009. « Regulated Ire1-Dependent Decay of Messenger RNAs in Mammalian Cells ». *The Journal of Cell Biology* 186 (3): 323-31. doi:10.1083/jcb.200903014.

Hong, Shin Yee, et Thilo Hagen. 2013. « Multiple Myeloma Leu167Ile (c.499C>A) Mutation Prevents XBP1 mRNA Splicing ». *British Journal of Haematology* 161 (6): 898-901. doi:10.1111/bjh.12310.

Houessinon, Aline, Albane Gicquel, Flora Bochereau, Christophe Louandre, Rémy Nyga, Corinne Godin, James Degonville, et al. 2016. « Alpha-Fetoprotein Is a Biomarker of Unfolded Protein Response and Altered Proteostasis in Hepatocellular Carcinoma Cells Exposed to Sorafenib ». *Cancer Letters* 370 (2): 242-49. doi:10.1016/j.canlet.2015.10.032.

Huang, L. Eric, et H. Franklin Bunn. 2003. « Hypoxia-Inducible Factor and Its Biomedical Relevance ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (22): 19575-78. doi:10.1074/jbc.R200030200.

Huber, Anne-Laure, Justine Lebeau, Patricia Guillaumot, Virginie Pétrilli, Mouhannad Malek, Julien Chilloux, Frédérique Fauvet, et al. 2013. « p58(IPK)-Mediated Attenuation of the Proapoptotic PERK-CHOP Pathway Allows Malignant Progression upon Low Glucose ». *Molecular Cell* 49 (6): 1049-59. doi:10.1016/j.molcel.2013.01.009.

Ikeda, Masafumi, Akihiro Sato, Nobuo Mochizuki, Kayo Toyosaki, Chika Miyoshi, Rumi Fujioka, Shuichi Mitsunaga, et al. 2016. « Phase I trial of GBS-01 for advanced pancreatic cancer refractory to gemcitabine ». *Cancer Science* 107 (12): 1818-24. doi:10.1111/cas.13086.

Imhof, Anna, Philippe Brunner, Nicolas Marincek, Matthias Briel, Christian Schindler, Helmut Rasch, Helmut R. Mäcke, Christoph Rochlitz, Jan Müller-Brand, et Martin A. Walter. 2011. « Response, Survival, and Long-Term Toxicity after Therapy with the Radiolabeled Somatostatin Analogue [90Y-DOTA]-TOC in Metastasized Neuroendocrine Cancers ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (17): 2416-23. doi:10.1200/JCO.2010.33.7873.

Inoki, Ken, Tianqing Zhu, et Kun-Liang Guan. 2003. « TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival ». *Cell* 115 (5): 577-90.

Inoue, H., Y. Tanizawa, J. Wasson, P. Behn, K. Kalidas, E. Bernal-Mizrachi, M. Mueckler, et al. 1998. « A Gene Encoding a Transmembrane Protein Is Mutated in Patients with Diabetes Mellitus and Optic Atrophy (Wolfram Syndrome) ». *Nature Genetics* 20 (2): 143-48. doi:10.1038/2441.

Ito, Tetsuhide, Hisato Igarashi, et Robert T. Jensen. 2012. « Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Clinical Features, Diagnosis and Medical Treatment: Advances ». *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* 26 (6): 737-53. doi:10.1016/j.bpg.2012.12.003.

Ito, Tetsuhide, Hironobu Sasano, Masao Tanaka, R. Yoshiyuki Osamura, Iwao Sasaki, Wataru Kimura, Koji Takano, et al. 2010. « Epidemiological Study of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors in Japan ». *Journal of Gastroenterology* 45 (2): 234-43. doi:10.1007/s00535-009-0194-8.

Iwakoshi, Neal N., Ann-Hwee Lee, Prasanth Vallabhajosyula, Kevin L. Otipoby, Klaus Rajewsky, et Laurie H. Glimcher. 2003. « Plasma Cell Differentiation and the Unfolded Protein Response Intersect at the Transcription Factor XBP-1 ». *Nature Immunology* 4 (4): 321-29. doi:10.1038/ni907.

Jamora, C., G. Dennert, et A. S. Lee. 1996. « Inhibition of Tumor Progression by Suppression of Stress Protein GRP78/BiP Induction in Fibrosarcoma B/C10ME ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (15): 7690-94.

Janson, E. Tiensuu, et Kjell Oberg. 2003. « Neuroendocrine Tumors--Somatostatin Receptor Expression and Somatostatin Analog Treatment ». *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers* 21: 535-46.

Jiao, Yuchen, Chanjuan Shi, Barish H. Edil, Roeland F. de Wilde, David S. Klimstra, Anirban Maitra, Richard D. Schulick, et al. 2011. « DAXX/ATRX, MEN1 and mTOR Pathway Genes are Frequently Altered in Pancreatic Neuroendocrine Tumors ». *Science (New York, N.Y.)* 331 (6021): 1199-1203. doi:10.1126/science.1200609.

Jin, Chun, Zhao Jin, Nian-Zhao Chen, Min Lu, Chang-bao Liu, Wan-Le Hu, et Chen-guo Zheng. 2016. « Activation of IRE1α-XBP1 Pathway Induces Cell Proliferation and Invasion in Colorectal Carcinoma ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 470 (1): 75-81. doi:10.1016/j.bbrc.2015.12.119.

Johannessen, Cory M., Elizabeth E. Reczek, Marianne F. James, Hilde Brems, Eric Legius, et Karen Cichowski. 2005. « The NF1 Tumor Suppressor Critically Regulates TSC2 and mTOR ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (24): 8573-78. doi:10.1073/pnas.0503224102.

Kaltsas, Gregory A., G. Michael Besser, et Ashley B. Grossman. 2004. « The Diagnosis and Medical Management of Advanced Neuroendocrine Tumors ». *Endocrine Reviews* 25 (3): 458-511. doi:10.1210/er.2003-0014.

Kan, Zhengyan, Bijay S. Jaiswal, Jeremy Stinson, Vasantharajan Janakiraman, Deepali Bhatt, Howard M. Stern, Peng Yue, et al. 2010. « Diverse Somatic Mutation Patterns and Pathway Alterations in Human Cancers ». *Nature* 466 (7308): 869-73. doi:10.1038/nature09208.

Kang, Y. J., M.-K. Lu, et K.-L. Guan. 2011. « The TSC1 and TSC2 Tumor Suppressors Are Required for Proper ER Stress Response and Protect Cells from ER Stress-Induced Apoptosis ». *Cell Death and Differentiation* 18 (1): 133-44. doi:10.1038/cdd.2010.82.

Kato, H, S Nakajima, Y Saito, S Takahashi, R Katoh, et M Kitamura. 2012. « mTORC1 serves ER stress-triggered apoptosis via selective activation of the IRE1-JNK pathway ». *Cell Death and Differentiation* 19 (2): 310-20. doi:10.1038/cdd.2011.98.

Kaufman, Randal J. 1999. « Stress Signaling from the Lumen of the Endoplasmic Reticulum: Coordination of Gene Transcriptional and Translational Controls ». *Genes & Development* 13 (10): 1211-33.

———. 2002. « Orchestrating the unfolded protein response in health and disease ». *The Journal of Clinical Investigation* 110 (10): 1389-98. doi:10.1172/JCI16886.

Ke, Qingdong, et Max Costa. 2006. « Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) ». *Molecular Pharmacology* 70 (5): 1469-80. doi:10.1124/mol.106.027029.

Kennedy, Andrew S., William A. Dezarn, Patrick McNeillie, Doug Coldwell, Charles Nutting, Dennis Carter, Ravi Murthy, et al. 2008. « Radioembolization for Unresectable Neuroendocrine Hepatic Metastases Using Resin 90Y-Microspheres: Early Results in 148 Patients ». *American Journal of Clinical Oncology* 31 (3): 271-79. doi:10.1097/COC.0b013e31815e4557.

Kern, Johann, Gerold Untergasser, Christoph Zenzmaier, Bettina Sarg, Guenther Gastl, Eberhard Gunsilius, et Michael Steurer. 2009. « GRP-78 Secreted by Tumor Cells Blocks the Antiangiogenic Activity of Bortezomib ». *Blood* 114 (18): 3960-67. doi:10.1182/blood-2009-03-209668.

Khagi, Simon, et Muhammad Wasif Saif. 2013. « Neuroendocrine Tumors: Treatment Updates ». *JOP. Journal of the Pancreas* 14 (4): 367-71.

Kharabi Masouleh, Behzad, Huimin Geng, Christian Hurtz, Lai N. Chan, Aaron C. Logan, Mi Sook Chang, Chuanxin Huang, et al. 2014. « Mechanistic Rationale for Targeting the Unfolded Protein Response in Pre-B Acute Lymphoblastic Leukemia ». *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America 111 (21): E2219-2228. doi:10.1073/pnas.1400958111.

Kim, Eunjung, Pankuri Goraksha-Hicks, Li Li, Thomas P. Neufeld, et Kun-Liang Guan. 2008. « Regulation of TORC1 by Rag GTPases in Nutrient Response ». *Nature Cell Biology* 10 (8): 935-45. doi:10.1038/ncb1753.

Kim, Ju-Young, Ji-Hwan Hwang, Mi-Ran Cha, Mi-Young Yoon, Eun-Soon Son, Akihiro Tomida, Bosung Ko, et al. 2010. « Arctigenin Blocks the Unfolded Protein Response and Shows Therapeutic Antitumor Activity ». *Journal of Cellular Physiology* 224 (1): 33-40. doi:10.1002/jcp.22085.

Kim, Kyoung Min, Tack Keun Yu, Hyun Hee Chu, Ho Sung Park, Kyu Yun Jang, Woo Sung Moon, Myoung Jae Kang, et al. 2012. « Expression of ER Stress and Autophagy-Related Molecules in Human Non-Small Cell Lung Cancer and Premalignant Lesions ». *International Journal of Cancer* 131 (4): E362-370. doi:10.1002/ijc.26463.

Kim, Seung Tae, Sang Yun Ha, Sujin Lee, Soomin Ahn, Jeeyun Lee, Se Hoon Park, Joon Oh Park, et al. 2016. « The Impact of PD-L1 Expression in Patients with Metastatic GEP-NETs ». *Journal of Cancer* 7 (5): 484-89. doi:10.7150/jca.13711.

Kim, Taeyoon, Chun-fa Zhang, Ziqing Sun, Heling Wu, et Y. Peng Loh. 2005. « Chromogranin A Deficiency in Transgenic Mice Leads to Aberrant Chromaffin Granule Biogenesis ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (30): 6958-61. doi:10.1523/JNEUROSCI.1058-05.2005.

Klieser, Eckhard, Romana Illig, Stefan Stättner, Florian Primavesi, Tarkan Jáger, Stefan Swierczynski, Tobias Kiesslich, et al. 2015. « Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic Neuroendocrine Tumors Is Linked to Clinicopathological Parameters and Possible Epigenetic Regulations ». *Anticancer Research* 35 (11): 6127-36.

Knight, Steven D., Nicholas D. Adams, Joelle L. Burgess, Amita M. Chaudhari, Michael G. Darcy, Carla A. Donatelli, Juan I. Luengo, et al. 2010. « Discovery of GSK2126458, a Highly Potent Inhibitor of PI3K and the Mammalian Target of Rapamycin ». *ACS Medicinal Chemistry Letters* 1 (1): 39-43. doi:10.1021/ml900028r.

Kölby, L., G. Persson, S. Franzén, et B. Ahrén. 2003. « Randomized Clinical Trial of the Effect of Interferon Alpha on Survival in Patients with Disseminated Midgut Carcinoid Tumours ». *The British Journal of Surgery* 90 (6): 687-93. doi:10.1002/bjs.4149.

Konno, H., T. Arai, T. Tanaka, M. Baba, K. Matsumoto, T. Kanai, S. Nakamura, et al. 1998. « Antitumor Effect of a Neutralizing Antibody to Vascular Endothelial Growth Factor on Liver Metastasis of Endocrine Neoplasm ». *Japanese Journal of Cancer Research: Gann* 89 (9): 933-39.

Koromilas, Antonis E. 2015. « Roles of the Translation Initiation Factor eIF2α Serine 51 Phosphorylation in Cancer Formation and Treatment ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1849 (7): 871-80. doi:10.1016/j.bbagrm.2014.12.007.

Koumenis, Constantinos, Christine Naczki, Marianne Koritzinsky, Sally Rastani, Alan Diehl, Nahum Sonenberg, Antonis Koromilas, et Bradly G. Wouters. 2002. « Regulation of Protein Synthesis by Hypoxia via Activation of the Endoplasmic Reticulum Kinase PERK and Phosphorylation of the Translation Initiation Factor eIF2alpha ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (21): 7405-16.

Kouvaraki, Maria A., Jaffer A. Ajani, Paulo Hoff, Robert Wolff, Douglas B. Evans, Richard Lozano, et James C. Yao. 2004. « Fluorouracil, Doxorubicin, and Streptozocin in the Treatment of Patients with Locally Advanced and Metastatic Pancreatic Endocrine Carcinomas ». *Journal*

of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology 22 (23): 4762-71. doi:10.1200/JCO.2004.04.024.

Krulich, L., A. P. Dhariwal, et S. M. McCann. 1968. « Stimulatory and Inhibitory Effects of Purified Hypothalamic Extracts on Growth Hormone Release from Rat Pituitary in Vitro ». *Endocrinology* 83 (4): 783-90. doi:10.1210/endo-83-4-783.

Kulke, Matthew H., Heinz-Josef Lenz, Neal J. Meropol, James Posey, David P. Ryan, Joel Picus, Emily Bergsland, et al. 2008. « Activity of Sunitinib in Patients with Advanced Neuroendocrine Tumors ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (20): 3403-10. doi:10.1200/JCO.2007.15.9020.

Kulke, Matthew H., Keith Stuart, Peter C. Enzinger, David P. Ryan, Jeffrey W. Clark, Alona Muzikansky, Michele Vincitore, Ann Michelini, et Charles S. Fuchs. 2006. « Phase II Study of Temozolomide and Thalidomide in Patients with Metastatic Neuroendocrine Tumors ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (3): 401-6. doi:10.1200/JCO.2005.03.6046.

Kumar, Manoj, Zheng-Ren Liu, Laxmi Thapa, Qing Chang, Da-Yu Wang, et Ren-Yi Qin. 2004. « Antiangiogenic Effect of Somatostatin Receptor Subtype 2 on Pancreatic Cancer Cell Line: Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor and Matrix Metalloproteinase-2 Expression in Vitro ». *World Journal of Gastroenterology* 10 (3): 393-99.

Kuroda, Kenji, Akio Horiguchi, Takako Asano, Keiichi Ito, Junichi Asakuma, Akinori Sato, Hidehiko Yoshii, Masamichi Hayakawa, Makoto Sumitomo, et Tomohiko Asano. 2011. « Glucose-Regulated Protein 78 Positivity as a Predictor of Poor Survival in Patients with Renal Cell Carcinoma ». *Urologia Internationalis* 87 (4): 450-56. doi:10.1159/000330883.

Kvols, Larry K., Kjell E. Oberg, Thomas M. O'Dorisio, Pharis Mohideen, Wouter W. de Herder, Rudolf Arnold, Ke Hu, et al. 2012. « Pasireotide (SOM230) Shows Efficacy and Tolerability in the Treatment of Patients with Advanced Neuroendocrine Tumors Refractory or Resistant to Octreotide LAR: Results from a Phase II Study ». *Endocrine-Related Cancer* 19 (5): 657-66. doi:10.1530/ERC-11-0367.

Kwekkeboom, Dik J., Wouter W. de Herder, Boen L. Kam, Casper H. van Eijck, Martijn van Essen, Peter P. Kooij, Richard A. Feelders, Maarten O. van Aken, et Eric P. Krenning. 2008. « Treatment with the Radiolabeled Somatostatin Analog [177 Lu-DOTA 0,Tyr3]octreotate: Toxicity, Efficacy, and Survival ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (13): 2124-30. doi:10.1200/JCO.2007.15.2553.

Lamarca, Angela, Thomas Walter, Marianne Pavel, Ivan Borbath, Patricia Freis, Barbara Nuñez, Alexa Childs, et al. 2017. « Design and Validation of the GI-NEC Score to Prognosticate Overall Survival in Patients With High-Grade Gastrointestinal Neuroendocrine Carcinomas ». *Journal of the National Cancer Institute* 109 (5). doi:10.1093/jnci/djw277.

Lamberts, Steven W.J., Aart-Jan van der Lely, Wouter W. de Herder, et Leo J. Hofland. 1996. « Octreotide ». *New England Journal of Medicine* 334 (4): 246-54. doi:10.1056/NEJM199601253340408.

Laplante, Mathieu, et David M. Sabatini. 2012. « mTOR Signaling in Growth Control and Disease ». *Cell* 149 (2): 274-93. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017.

———. 2013. « Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance ». *Journal of Cell Science* 126 (8): 1713-19. doi:10.1242/jcs.125773.

Larsson, Dhana E., Malin Wickström, Sadia Hassan, Kjell Öberg, et Dan Granberg. 2010. « The Cytotoxic Agents NSC-95397, Brefeldin A, Bortezomib and Sanguinarine Induce Apoptosis in Neuroendocrine Tumors In Vitro ». *Anticancer Research* 30 (1): 149-56.

Lattuada, D., C. Casnici, A. Venuto, et O. Marelli. 2002. « The Apoptotic Effect of Somatostatin Analogue SMS 201-995 on Human Lymphocytes ». *Journal of Neuroimmunology* 133 (1-2): 211-16.

Lawrence, Ben, Bjorn I. Gustafsson, Anthony Chan, Bernhard Svejda, Mark Kidd, et Irvin M. Modlin. 2011. « The Epidemiology of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors ». *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 40 (1): 1-18, vii. doi:10.1016/j.ecl.2010.12.005.

Lee, A. S. 1992. « Mammalian Stress Response: Induction of the Glucose-Regulated Protein Family ». *Current Opinion in Cell Biology* 4 (2): 267-73.

Lee, Jaemin, Cheng Sun, Yingjiang Zhou, Justin Lee, Deniz Gokalp, Hilde Herrema, Sang Won Park, Roger J. Davis, et Umut Ozcan. 2011. « p38 MAPK-Mediated Regulation of Xbp1s Is Crucial for Glucose Homeostasis ». *Nature Medicine* 17 (10): 1251-60. doi:10.1038/nm.2449.

Lepage, C., A. M. Bouvier, J. M. Phelip, C. Hatem, C. Vernet, et J. Faivre. 2004. « Incidence and Management of Malignant Digestive Endocrine Tumours in a Well Defined French Population ». *Gut* 53 (4): 549-53. doi:10.1136/gut.2003.026401.

Leung-Hagesteijn, Chungyee, Natalie Erdmann, Grace Cheung, Jonathan J. Keats, A. Keith Stewart, Donna E. Reece, Kim Chan Chung, et Rodger E. Tiedemann. 2013. « Xbp1s-Negative Tumor B Cells and Pre-Plasmablasts Mediate Therapeutic Proteasome Inhibitor Resistance in Multiple Myeloma ». *Cancer Cell* 24 (3): 289-304. doi:10.1016/j.ccr.2013.08.009.

Lewis, Paul D. 1996. *The Endocrine System*. Churchill Livingstone.

Li, Long-Zhu, Hong-Xia Deng, Wen-Zhu Lou, Xue-Yan Sun, Meng-Wan Song, Jing Tao, Bing-Xiu Xiao, et Jun-Ming Guo. 2012. « Growth Inhibitory Effect of 4-Phenyl Butyric Acid on Human Gastric Cancer Cells Is Associated with Cell Cycle Arrest ». *World Journal of Gastroenterology* 18 (1): 79-83. doi:10.3748/wjg.v18.i1.79.

Li, Yu, Shanqin Xu, Amber Giles, Kazuto Nakamura, Jong Woo Lee, Xiuyun Hou, Gizem Donmez, et al. 2011. « Hepatic Overexpression of SIRT1 in Mice Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress and Insulin Resistance in the Liver ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25 (5): 1664-79. doi:10.1096/fj.10-173492.

Li, Zongwei, et Zhuoyu Li. 2012. « Glucose Regulated Protein 78: A Critical Link between Tumor Microenvironment and Cancer Hallmarks ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1826 (1): 13-22. doi:10.1016/j.bbcan.2012.02.001.

Lipson, Evan J., Jeremy G. Vincent, Myriam Loyo, Luciane T. Kagohara, Brandon S. Luber, Hao Wang, Haiying Xu, et al. 2013. « PD-L1 Expression in the Merkel Cell Carcinoma Microenvironment: Association with Inflammation, Merkel Cell Polyomavirus and Overall Survival ». *Cancer Immunology Research* 1 (1): 54-63. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0034.

Lombard-Bohas, C., E. Mitry, D. O'Toole, C. Louvet, D. Pillon, G. Cadiot, F. Borson-Chazot, et al. 2009. « Thirteen-Month Registration of Patients with Gastroenteropancreatic Endocrine Tumours in France ». *Neuroendocrinology* 89 (2): 217-22. doi:10.1159/000151562.

Lu, Zhenya, Furong Liu, Linglin Chen, Huadan Zhang, Yuemin Ding, Jianxiang Liu, Michael Wong, et Ling-Hui Zeng. 2015. « Effect of Chronic Administration of Low Dose Rapamycin on

Development and Immunity in Young Rats ». *PloS One* 10 (8): e0135256. doi:10.1371/journal.pone.0135256.

Luo, Biquan, et Amy S. Lee. 2013. « The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anti-cancer therapies ». *Oncogene* 32 (7). doi:10.1038/onc.2012.130.

Ma, Xiaoju Max, et John Blenis. 2009. « Molecular Mechanisms of mTOR-Mediated Translational Control ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (5): 307-18. doi:10.1038/nrm2672.

Ma, Yanjun, et Linda M. Hendershot. 2004. « The Role of the Unfolded Protein Response in Tumour Development: Friend or Foe? » *Nature Reviews Cancer* 4 (12): 966-77. doi:10.1038/nrc1505.

Maher, E. R., L. Iselius, J. R. Yates, M. Littler, C. Benjamin, R. Harris, J. Sampson, A. Williams, M. A. Ferguson-Smith, et N. Morton. 1991. « Von Hippel-Lindau Disease: A Genetic Study ». *Journal of Medical Genetics* 28 (7): 443-47.

Mahoney, Douglas J., Charles Lefebvre, Kristina Allan, Jan Brun, Cina A. Sanaei, Stephen Baird, Nelson Pearce, et al. 2011. « Virus-Tumor Interactome Screen Reveals ER Stress Response Can Reprogram Resistant Cancers for Oncolytic Virus-Triggered Caspase-2 Cell Death ». *Cancer Cell* 20 (4): 443-56. doi:10.1016/j.ccr.2011.09.005.

Marciniak, Stefan J., Chi Y. Yun, Seiichi Oyadomari, Isabel Novoa, Yuhong Zhang, Rivka Jungreis, Kazuhiro Nagata, Heather P. Harding, et David Ron. 2004. « CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum ». *Genes & Development* 18 (24): 3066-77. doi:10.1101/gad.1250704.

Marion-Audibert, Anne-Marie, Cécile Barel, Géraldine Gouysse, Jérôme Dumortier, Frank Pilleul, Céline Pourreyron, Valérie Hervieu, et al. 2003. « Low Microvessel Density Is an Unfavorable Histoprognostic Factor in Pancreatic Endocrine Tumors ». *Gastroenterology* 125 (4): 1094-1104.

Martin, George A., David Viskoohil, Gideon Bollag, Peter C. McCabe, Walter J. Crosier, Heinz Haubruck, Leah Conroy, et al. 1990. « The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21 ». *Cell* 63 (4): 843-49. doi:10.1016/0092-8674(90)90150-D.

Massironi, Sara, Valentina Sciola, Maddalena Peracchi, Clorinda Ciafardini, Matilde Pia Spampatti, et Dario Conte. 2008. « Neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system ». *World Journal of Gastroenterology : WJG* 14 (35): 5377-84. doi:10.3748/wjg.14.5377.

Maurel, M., E. Chevet, J. Tavernier, et S. Gerlo. 2014. « Getting RIDD of RNA: IRE1 in Cell Fate Regulation ». *Trends in Biochemical Sciences* 39 (5): 245-54. doi:10.1016/j.tibs.2014.02.008.

McGaughran, J. M., D. I. Harris, D. Donnai, D. Teare, R. MacLeod, R. Westerbeek, H. Kingston, M. Super, R. Harris, et D. G. R. Evans. 1999. « A Clinical Study of Type 1 Neurofibromatosis in North West England ». *Journal of Medical Genetics* 36 (3): 197-203. doi:10.1136/jmg.36.3.197.

Mendel, Dirk B., A. Douglas Laird, Xiaohua Xin, Sharianne G. Louie, James G. Christensen, Guangmin Li, Randall E. Schreck, et al. 2003. « In Vivo Antitumor Activity of SU11248, a Novel Tyrosine Kinase Inhibitor Targeting Vascular Endothelial Growth Factor and Platelet-Derived Growth Factor Receptors: Determination of a Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Relationship ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 9 (1): 327-37.

Mimura, Naoya, Mariateresa Fulciniti, Gullu Gorgun, Yu-Tzu Tai, Diana Cirstea, Loredana Santo, Yiguo Hu, et al. 2012. « Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1α is a promising therapeutic option in multiple myeloma ». *Blood* 119 (24): 5772-81. doi:10.1182/blood-2011-07-366633.

Misra, Uma K., et Salvatore V. Pizzo. 2012. « Receptor-Recognized ?2-Macroglobulin Binds to Cell Surface-Associated GRP78 and Activates mTORC1 and mTORC2 Signaling in Prostate Cancer Cells ». *PLoS ONE* 7 (12). doi:10.1371/journal.pone.0051735.

Missiaglia, Edoardo, Irene Dalai, Stefano Barbi, Stefania Beghelli, Massimo Falconi, Marco della Peruta, Lorenzo Piemonti, et al. 2010. « Pancreatic Endocrine Tumors: Expression Profiling Evidences a Role for AKT-mTOR Pathway ». *Journal of Clinical Oncology* 28 (2): 245-55. doi:10.1200/JCO.2008.21.5988.

Mitry, E, E Baudin, M Ducreux, J-C Sabourin, P Rufié, T Aparicio, P Lasser, et al. 1999. « Treatment of poorly differentiated neuroendocrine tumours with etoposide and cisplatin ». *British Journal of Cancer* 81 (8): 1351-55. doi:10.1038/sj.bjc.6690325.

Mitry, Emmanuel, Thomas Walter, Eric Baudin, Jean-Emmanuel Kurtz, Philippe Ruszniewski, Sophie Dominguez-Tinajero, Leïla Bengrine-Lefevre, et al. 2014. « Bevacizumab plus Capecitabine in Patients with Progressive Advanced Well-Differentiated Neuroendocrine Tumors of the Gastro-Intestinal (GI-NETs) Tract (BETTER Trial)--a Phase II Non-Randomised Trial ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 50 (18): 3107-15. doi:10.1016/j.ejca.2014.10.001.

Mitsiades, Constantine S., Nicholas Mitsiades, Vassiliki Poulaki, Robert Schlossman, Masaharu Akiyama, Dharminder Chauhan, Teru Hideshima, et al. 2002. « Activation of NF-kappaB and Upregulation of Intracellular Anti-Apoptotic Proteins via the IGF-1/Akt Signaling in Human Multiple Myeloma Cells: Therapeutic Implications ». *Oncogene* 21 (37): 5673-83. doi:10.1038/sj.onc.1205664.

Modlin, Irvin M., Lisa Bodei, et Mark Kidd. 2016. « Neuroendocrine Tumor Biomarkers: From Monoanalytes to Transcripts and Algorithms ». *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 30 (1): 59-77. doi:10.1016/j.beem.2016.01.002.

Modlin, Irvin M., Ignat Drozdov, et Mark S. Kidd. 2013. « A multitranscript blood neuroendocrine tumor molecular signature to identify treatment efficacy and disease progress ». *Journal of Clinical Oncology* 31 (suppl; abstr 4137). http://meetinglibrary.asco.org/content/115116-132.

Modlin, Irvin M., Mark Kidd, Igor Latich, Michelle N. Zikusoka, et Michael D. Shapiro. 2005. « Current Status of Gastrointestinal Carcinoids ». *Gastroenterology* 128 (6): 1717-51.

Moertel, C. G., L. K. Kvols, M. J. O'Connell, et J. Rubin. 1991. « Treatment of Neuroendocrine Carcinomas with Combined Etoposide and Cisplatin. Evidence of Major Therapeutic Activity in the Anaplastic Variants of These Neoplasms ». *Cancer* 68 (2): 227-32.

Moertel, C. G., M. Lefkopoulo, S. Lipsitz, R. G. Hahn, et D. Klaassen. 1992. « Streptozocin-Doxorubicin, Streptozocin-Fluorouracil or Chlorozotocin in the Treatment of Advanced Islet-Cell Carcinoma ». *The New England Journal of Medicine* 326 (8): 519-23. doi:10.1056/NEJM199202203260804.

Montuenga, Luis M., Laura Guembe, M. Angela Burrell, M. Elena Bodegas, Alfonso Calvo, Jesús J. Sola, Pilar Sesma, et Ana C. Villaro. 2003. « The Diffuse Endocrine System: From Embryogenesis to Carcinogenesis ». *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 38 (2): 155-272.

Moore, Kristin A., et Julie Hollien. 2012. « The Unfolded Protein Response in Secretory Cell Function ». *Annual Review of Genetics* 46: 165-83. doi:10.1146/annurev-genet-110711-155644.

Musunuru, Sandeepa, Jennifer E. Carpenter, Rebecca S. Sippel, Muthusamy Kunnimalaiyaan, et Herbert Chen. 2005. « A Mouse Model of Carcinoid Syndrome and Heart Disease ». *The Journal of Surgical Research* 126 (1): 102-5. doi:10.1016/j.jss.2005.01.003.

Nakagawa, Hayato, Atsushi Umemura, Koji Taniguchi, Joan Font-Burgada, Debanjan Dhar, Hisanobu Ogata, Zhenyu Zhong, et al. 2014. « ER Stress Cooperates with Hypernutrition to Trigger TNF-Dependent Spontaneous HCC Development ». *Cancer Cell* 26 (3): 331-43. doi:10.1016/j.ccr.2014.07.001.

Nakamura, Shinsuke, Haruka Takizawa, Masamitsu Shimazawa, Yuhei Hashimoto, Sou Sugitani, Kazuhiro Tsuruma, et Hideaki Hara. 2013. « Mild Endoplasmic Reticulum Stress Promotes Retinal Neovascularization via Induction of BiP/GRP78 ». *PLOS ONE* 8 (3): e60517. doi:10.1371/journal.pone.0060517.

Nghiem, Paul T., Shailender Bhatia, Evan J. Lipson, Ragini R. Kudchadkar, Natalie J. Miller, Lakshmanan Annamalai, Sneha Berry, et al. 2016. « PD-1 Blockade with Pembrolizumab in Advanced Merkel-Cell Carcinoma ». *New England Journal of Medicine* 374 (26): 2542-52. doi:10.1056/NEJMoa1603702.

Niederreiter, Lukas, Teresa M. J. Fritz, Timon E. Adolph, Anna-Maria Krismer, Felix A. Offner, Markus Tschurtschenthaler, Magdalena B. Flak, et al. 2013. « ER Stress Transcription Factor Xbp1 Suppresses Intestinal Tumorigenesis and Directs Intestinal Stem Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 210 (10): 2041-56. doi:10.1084/jem.20122341.

Nikawa, J., et S. Yamashita. 1992. « IRE1 Encodes a Putative Protein Kinase Containing a Membrane-Spanning Domain and Is Required for Inositol Phototrophy in Saccharomyces Cerevisiae ». *Molecular Microbiology* 6 (11): 1441-46.

Niu, Zheyu, Mengyi Wang, Li Zhou, Lutian Yao, Quan Liao, et Yupei Zhao. 2015. « Elevated GRP78 Expression Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Pancreatic Cancer ». *Scientific Reports* 5 (novembre): 16067. doi:10.1038/srep16067.

Nordstrom-O'Brien, Morgan, Rob B. van der Luijt, Ellen van Rooijen, Ans M. van den Ouweland, Danielle F. Majoor-Krakauer, Martijn P. Lolkema, Aram van Brussel, Emile E. Voest, et Rachel H. Giles. 2010. « Genetic Analysis of von Hippel-Lindau Disease ». *Human Mutation* 31 (5): 521-37. doi:10.1002/humu.21219.

Norton, Jeffrey A. 2006. « Surgery for Primary Pancreatic Neuroendocrine Tumors ». *Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 10 (3): 327-31. doi:10.1016/j.gassur.2005.08.023.

Norton, Jeffrey A., Robert S. Warren, Mary G. Kelly, Marlene B. Zuraek, et Robert T. Jensen. 2003. « Aggressive Surgery for Metastatic Liver Neuroendocrine Tumors ». *Surgery* 134 (6): 1057-1063-1065. doi:10.1016/j.surg.2003.07.025.

Öberg, K., K. Funa, et G. Alm. 1983. « Effects of Leukocyte Interferon on Clinical Symptoms and Hormone Levels in Patients with Mid-Gut Carcinoid Tumors and Carcinoid Syndrome ». *New England Journal of Medicine* 309 (3): 129-33. doi:10.1056/NEJM198307213090301.

Odisho, Tanya, Liling Zhang, et Allen Volchuk. 2015. « ATF6β regulates the Wfs1 gene and has a cell survival role in the ER stress response in pancreatic β-cells ». *Experimental Cell Research* 330 (1): 111-22. doi:10.1016/j.yexcr.2014.10.007.

Okada, Tetsuya, Hiderou Yoshida, Rieko Akazawa, Manabu Negishi, et Kazutoshi Mori. 2002. « Distinct Roles of Activating Transcription Factor 6 (ATF6) and Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK) in Transcription during the Mammalian Unfolded Protein Response ». *The Biochemical Journal* 366 (Pt 2): 585-94. doi:10.1042/BJ20020391.

Ozcan, Lale, et Ira Tabas. 2012. « Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Disease and Other Disorders ». *Annual Review of Medicine* 63: 317-28. doi:10.1146/annurev-med-043010-144749.

Ozcan, Umut, Lale Ozcan, Erkan Yilmaz, Katrin Duvel, Mustafa Sahin, Brendan D. Manning, et Gokhan S. Hotamisligil. 2008. « Loss of the Tuberous Sclerosis Complex Tumor Suppressors Triggers the Unfolded Protein Response to Regulate Insulin Signaling and Apoptosis ». *Molecular cell* 29 (5): 541-51. doi:10.1016/j.molcel.2007.12.023.

Ozcan, Umut, Erkan Yilmaz, Lale Ozcan, Masato Furuhashi, Eric Vaillancourt, Ross O. Smith, Cem Z. Görgün, et Gökhan S. Hotamisligil. 2006. « Chemical Chaperones Reduce ER Stress and Restore Glucose Homeostasis in a Mouse Model of Type 2 Diabetes ». *Science (New York, N.Y.)* 313 (5790): 1137-40. doi:10.1126/science.1128294.

Pakos-Zebrucka, Karolina, Izabela Koryga, Katarzyna Mnich, Mila Ljujic, Afshin Samali, et Adrienne M. Gorman. 2016. « The Integrated Stress Response ». *EMBO Reports* 17 (10): 1374-95. doi:10.15252/embr.201642195.

Palam, L. R., J. Gore, K. E. Craven, J. L. Wilson, et M. Korc. 2015. « Integrated Stress Response Is Critical for Gemcitabine Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma ». *Cell Death & Disease* 6 (octobre): e1913. doi:10.1038/cddis.2015.264.

Panten, U., J. Burgfeld, F. Goerke, M. Rennicke, M. Schwanstecher, A. Wallasch, B. J. Zünkler, et S. Lenzen. 1989. « Control of Insulin Secretion by Sulfonylureas, Meglitinide and Diazoxide in Relation to Their Binding to the Sulfonylurea Receptor in Pancreatic Islets ». *Biochemical Pharmacology* 38 (8): 1217-29.

Panzuto, F., M. Di Fonzo, E. Iannicelli, R. Sciuto, C. L. Maini, G. Capurso, M. Milione, et al. 2006. « Long-Term Clinical Outcome of Somatostatin Analogues for Treatment of Progressive, Metastatic, Well-Differentiated Entero-Pancreatic Endocrine Carcinoma ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 17 (3): 461-66. doi:10.1093/annonc/mdj113.

Papandreou, Ioanna, Nicholas C. Denko, Michael Olson, Heleen Van Melckebeke, Sofie Lust, Arvin Tam, David E. Solow-Cordero, et al. 2011. « Identification of an Ire1alpha Endonuclease Specific Inhibitor with Cytotoxic Activity against Human Multiple Myeloma ». *Blood* 117 (4): 1311-14. doi:10.1182/blood-2010-08-303099.

Pavel, M., H. Jann, V. Prasad, I. Drozdov, I. M. Modlin, et M. Kidd. 2016. « NET Blood Transcript Analysis Defines the Crossing of the Clinical Rubicon: When Stable Disease Becomes Progressive ». *Neuroendocrinology* 0 (0). doi:10.1159/000446025.

Pavel, Marianne E, John D Hainsworth, Eric Baudin, Marc Peeters, Dieter Hörsch, Robert E Winkler, Judith Klimovsky, et al. 2011. « Everolimus plus Octreotide Long-Acting Repeatable for the Treatment of Advanced Neuroendocrine Tumours Associated with Carcinoid Syndrome (RADIANT-2): A Randomised, Placebo-Controlled, Phase 3 Study ». *The Lancet* 378 (9808): 2005-12. doi:10.1016/S0140-6736(11)61742-X.

Pavitt, Graham D., et David Ron. 2012. « New Insights into Translational Regulation in the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (6). doi:10.1101/cshperspect.a012278.

Pellegata, Natalia S., Leticia Quintanilla-Martinez, Heide Siggelkow, Elenore Samson, Karin Bink, Heinz Höfler, Falko Fend, Jochen Graw, et Michael J. Atkinson. 2006. « Germ-Line Mutations in p27Kip1 Cause a Multiple Endocrine Neoplasia Syndrome in Rats and Humans ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (42): 15558-63. doi:10.1073/pnas.0603877103.

Peracchi, M., D. Conte, C. Gebbia, C. Penati, S. Pizzinelli, M. Arosio, S. Corbetta, et A. Spada. 2003. « Plasma Chromogranin A in Patients with Sporadic Gastro-Entero-Pancreatic Neuroendocrine Tumors or Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 ». *European Journal of Endocrinology* 148 (1): 39-43. doi:10.1530/eje.0.1480039.

Perkins, Darren J., et Glen N. Barber. 2004. « Defects in Translational Regulation Mediated by the Alpha Subunit of Eukaryotic Initiation Factor 2 Inhibit Antiviral Activity and Facilitate the Malignant Transformation of Human Fibroblasts ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (5): 2025-40.

Peterson, Timothy R., Shomit S. Sengupta, Thurl E. Harris, Anne E. Carmack, Seong A. Kang, Eric Balderas, David A. Guertin, et al. 2011. « mTOR Complex 1 Regulates Lipin 1 Localization to Control the SREBP Pathway ». *Cell* 146 (3): 408-20. doi:10.1016/j.cell.2011.06.034.

Phan, Alexandria T., Daniel M. Halperin, Jennifer A. Chan, David R. Fogelman, Kenneth R. Hess, Paige Malinowski, Eileen Regan, Chaan S. Ng, James C. Yao, et Matthew H. Kulke. 2015. « Pazopanib and Depot Octreotide in Advanced, Well-Differentiated Neuroendocrine Tumours: A Multicentre, Single-Group, Phase 2 Study ». *The Lancet. Oncology* 16 (6): 695-703. doi:10.1016/S1470-2045(15)70136-1.

Pietras, Kristian, et Douglas Hanahan. 2005. « A Multitargeted, Metronomic, and Maximum-Tolerated Dose “chemo-Switch” regimen Is Antiangiogenic, Producing Objective Responses and Survival Benefit in a Mouse Model of Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (5): 939-52. doi:10.1200/JCO.2005.07.093.

Pirker, R. A., J. Pont, R. Pöhnl, W. Schütz, A. Griesmacher, et M. M. Müller. 1998. « Usefulness of Chromogranin A as a Marker for Detection of Relapses of Carcinoid Tumours ». *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 36 (11): 837-40. doi:10.1515/CCLM.1998.147.

Pluquet, Olivier, Nicolas Dejeans, Marion Bouchecareilh, Stephanie Lhomond, Raphael Pineau, Arisa Higa, Maylis Delugin, et al. 2013. « Posttranscriptional Regulation of PER1 Underlies the Oncogenic Function of IREα ». *Cancer Research* 73 (15): 4732-43. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3989.

Podsypanina, K., R. T. Lee, C. Politis, I. Hennessy, A. Crane, J. Puc, M. Neshat, et al. 2001. « An Inhibitor of mTOR Reduces Neoplasia and Normalizes p70/S6 Kinase Activity in Pten+/- Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (18): 10320-25. doi:10.1073/pnas.171060098.

Poncet, Gilles, Karine Villaume, Thomas Walter, Céline Pourreyron, Aurélie Theillaumas, Florian Lépinasse, Valérie Hervieu, Martine Cordier-Bussat, Jean-Yves Scoazec, et Colette Roche. 2009. « Angiogenesis and Tumor Progression in Neuroendocrine Digestive Tumors ». *The Journal of Surgical Research* 154 (1): 68-77. doi:10.1016/j.jss.2008.03.055.

Pootrakul, Llana, Ram H. Datar, Shan-Rong Shi, Jie Cai, Debra Hawes, Susan G. Groshen, Amy S. Lee, et Richard J. Cote. 2006. « Expression of Stress Response Protein Grp78 Is Associated with the Development of Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12 (20 Pt 1): 5987-93. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0133.

Porter, K. R., A. Claude, et E. F. Fullam. 1945. « A STUDY OF TISSUE CULTURE CELLS BY ELECTRON MICROSCOPY : METHODS AND PRELIMINARY OBSERVATIONS ». *The Journal of Experimental Medicine* 81 (3): 233-46.

Pourreyron, Céline, Gilles Poncet, Colette Roche, Géraldine Gouysse, Mimoun Nejjari, Thomas Walter, Karine Villaume, et al. 2008. « The Role of Angiogenesis in Endocrine Liver Metastases: An Experimental Study ». *Journal of Surgical Research* 144 (1): 64-73. doi:10.1016/j.jss.2007.02.045.

Prischi, Filippo, Piotr R. Nowak, Marta Carrara, et Maruf M. U. Ali. 2014. « Phosphoregulation of Ire1 RNase Splicing Activity ». *Nature Communications* 5 (avril): 3554. doi:10.1038/ncomms4554.

Pyrko, Peter, Axel H. Schönthal, Florence M. Hofman, Thomas C. Chen, et Amy S. Lee. 2007. « The Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP as a Novel Target for Increasing Chemosensitivity in Malignant Gliomas ». *Cancer Research* 67 (20): 9809-16. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0625.

Qian, Zhi Rong, Monica Ter-Minassian, Jennifer A. Chan, Yu Imamura, Susanne M. Hooshmand, Aya Kuchiba, Teppei Morikawa, et al. 2013. « Prognostic Significance of MTOR Pathway Component Expression in Neuroendocrine Tumors ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (27): 3418-25. doi:10.1200/JCO.2012.46.6946.

Que, F. G., D. M. Nagorney, K. P. Batts, L. J. Linz, et L. K. Kvols. 1995. « Hepatic Resection for Metastatic Neuroendocrine Carcinomas ». *American Journal of Surgery* 169 (1): 36-42-43.

Ranganathan, Aparna C., Shishir Ojha, Antonis Kourtidis, Douglas S. Conklin, et Julio A. Aguirre-Ghiso. 2008. « Dual Function of Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase in Tumor Cell Growth Arrest and Survival ». *Cancer Research* 68 (9): 3260-68. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6215.

Raymond, Eric, Laetitia Dahan, Jean-Luc Raoul, Yung-Jue Bang, Ivan Borbath, Catherine Lombard-Bohas, Juan Valle, et al. 2011. « Sunitinib Malate for the Treatment of Pancreatic Neuroendocrine Tumors ». *New England Journal of Medicine* 364 (6): 501-13. doi:10.1056/NEJMoa1003825.

Raymond, Eric, Sandrine Faivre, et Philippe Ruszniewski. 2014. *Management of Neuroendocrine Tumors of the Pancreas and Digestive Tract: From Surgery to Targeted Therapies: A Multidisciplinary Approach*. Springer.

Reichlin, S. 1983. « Somatostatin ». *The New England Journal of Medicine* 309 (24): 1495-1501. doi:10.1056/NEJM198312153092406.

Reidy, Diane L., Laura H. Tang, et Leonard B. Saltz. 2009. « Treatment of Advanced Disease in Patients with Well-Differentiated Neuroendocrine Tumors ». *Nature Clinical Practice. Oncology* 6 (3): 143-52. doi:10.1038/ncponc1326.

Reimold, A. M., N. N. Iwakoshi, J. Manis, P. Vallabhajosyula, E. Szomolanyi-Tsuda, E. M. Gravallese, D. Friend, M. J. Grusby, F. Alt, et L. H. Glimcher. 2001. « Plasma Cell Differentiation Requires the Transcription Factor XBP-1 ». *Nature* 412 (6844): 300-307. doi:10.1038/35085509.

Rhee, Thomas K., Robert J. Lewandowski, David M. Liu, Mary F. Mulcahy, Gary Takahashi, Paul D. Hansen, Al B. Benson, Andrew S. Kennedy, Reed A. Omary, et Riad Salem. 2008. « 90Y Radioembolization for Metastatic Neuroendocrine Liver Tumors: Preliminary Results from a Multi-Institutional Experience ». *Annals of Surgery* 247 (6): 1029-35. doi:10.1097/SLA.0b013e3181728a45.

Ri, Masaki. 2016. « Endoplasmic-Reticulum Stress Pathway-Associated Mechanisms of Action of Proteasome Inhibitors in Multiple Myeloma ». *International Journal of Hematology* 104 (3): 273-80. doi:10.1007/s12185-016-2016-0.

Rindi, G., S. G. Grant, Y. Yiangou, M. A. Ghatei, S. R. Bloom, V. L. Bautch, E. Solcia, et J. M. Polak. 1990. « Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. Heterogeneity of hormone expression. » *The American Journal of Pathology* 136 (6): 1349-63.

Rindi, G., G. Klöppel, H. Alhman, M. Caplin, A. Couvelard, W. W. de Herder, B. Erikssson, et al. 2006. « TNM Staging of Foregut (Neuro)endocrine Tumors: A Consensus Proposal Including a Grading System ». *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 449 (4): 395-401. doi:10.1007/s00428-006-0250-1.

Rindi, G., G. Klöppel, A. Couvelard, P. Komminoth, M. Körner, J. M. Lopes, A.-M. McNicol, et al. 2007. « TNM Staging of Midgut and Hindgut (Neuro) Endocrine Tumors: A Consensus Proposal Including a Grading System ». *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 451 (4): 757-62. doi:10.1007/s00428-007-0452-1.

Rindi, G., G. Petrone, et F. Inzani. 2014. « The 2010 WHO Classification of Digestive Neuroendocrine Neoplasms: A Critical Appraisal Four Years after Its Introduction ». *Endocrine Pathology* 25 (2): 186-92. doi:10.1007/s12022-014-9313-z.

Rinke, Anja, Hans-Helge Müller, Carmen Schade-Brittinger, Klaus-Jochen Klose, Peter Barth, Matthias Wied, Christina Mayer, et al. 2009. « Placebo-Controlled, Double-Blind, Prospective, Randomized Study on the Effect of Octreotide LAR in the Control of Tumor Growth in Patients with Metastatic Neuroendocrine Midgut Tumors: A Report from the PROMID Study Group ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (28): 4656-63. doi:10.1200/JCO.2009.22.8510.

Romer, A., D. Seiler, N. Marincek, P. Brunner, M. T. Koller, Q. K. T. Ng, H. R. Maecke, et al. 2014. « Somatostatin-Based Radiopeptide Therapy with [177Lu-DOTA]-TOC versus [90Y-DOTA]-TOC in Neuroendocrine Tumours ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 41 (2): 214-22. doi:10.1007/s00259-013-2559-8.

Romero-Ramirez, Lorenzo, Hongbin Cao, Daniel Nelson, Ester Hammond, Ann-Hwee Lee, Hiderou Yoshida, Kazutoshi Mori, et al. 2004. « XBP1 Is Essential for Survival under Hypoxic Conditions and Is Required for Tumor Growth ». *Cancer Research* 64 (17): 5943-47. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1606.

Rouschop, Kasper M., Ludwig J. Dubois, Tom G. Keulers, Twan van den Beucken, Philippe Lambin, Johan Bussink, Albert J. van der Kogel, Marianne Koritzinsky, et Bradly G. Wouters. 2013. « PERK/eIF2α Signaling Protects Therapy Resistant Hypoxic Cells through Induction of Glutathione Synthesis and Protection against ROS ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (12): 4622-27. doi:10.1073/pnas.1210633110.

Rubin, J., J. Ajani, W. Schirmer, A. P. Venook, R. Bukowski, R. Pommier, L. Saltz, P. Dandona, et L. Anthony. 1999. « Octreotide Acetate Long-Acting Formulation versus Open-Label

Subcutaneous Octreotide Acetate in Malignant Carcinoid Syndrome ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 17 (2): 600-606. doi:10.1200/JCO.1999.17.2.600.

Rutkowski, D. Thomas, et Randal J. Kaufman. 2004. « A trip to the ER: coping with stress ». *Trends in Cell Biology* 14 (1): 20-28. doi:10.1016/j.tcb.2003.11.001.

Salazar, Ramon, Chris Verslype, Eric Baudin, Steven K. Libutti, James C. Yao, Roberto Buzzoni, Lorenzo Antonuzzo, et al. 2015. « Phase II studies of BEZ235 in patients with advanced pancreatic neuroendocrine tumors (pNET) ». *Journal of Clinical Oncology* 33 (suppl; abstr 4102). http://meetinglibrary.asco.org/content/150239-156.

Saltz, L., B. Trochanowski, M. Buckley, B. Heffernan, D. Niedzwiecki, Y. Tao, et D. Kelsen. 1993. « Octreotide as an Antineoplastic Agent in the Treatment of Functional and Nonfunctional Neuroendocrine Tumors ». *Cancer* 72 (1): 244-48.

Sancak, Yasemin, Timothy R. Peterson, Yoav D. Shaul, Robert A. Lindquist, Carson C. Thoreen, Liron Bar-Peled, et David M. Sabatini. 2008. « The Rag GTPases Bind Raptor and Mediate Amino Acid Signaling to mTORC1 ». *Science (New York, N.Y.)* 320 (5882): 1496-1501. doi:10.1126/science.1157535.

Sanjana, Neville E., Ophir Shalem, et Feng Zhang. 2014. « Improved Vectors and Genome-Wide Libraries for CRISPR Screening ». *Nature Methods* 11 (8): 783-84. doi:10.1038/nmeth.3047.

Sano, Renata, et John C. Reed. 2013. « ER Stress-Induced Cell Death Mechanisms ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1833 (12): 3460-70. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.028.

Sarbassov, D. D., David A. Guertin, Siraj M. Ali, et David M. Sabatini. 2005. « Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex ». *Science (New York, N.Y.)* 307 (5712): 1098-1101. doi:10.1126/science.1106148.

Sarbassov, Dos D., Siraj M. Ali, Shomit Sengupta, Joon-Ho Sheen, Peggy P. Hsu, Alex F. Bagley, Andrew L. Markhard, et David M. Sabatini. 2006. « Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB ». *Molecular Cell* 22 (2): 159-68. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.029.

Sarmiento, Juan M., Glenroy Heywood, Joseph Rubin, Duane M. Ilstrup, David M. Nagorney, et Florencia G. Que. 2003. « Surgical Treatment of Neuroendocrine Metastases to the Liver: A Plea for Resection to Increase Survival ». *Journal of the American College of Surgeons* 197 (1): 29-37. doi:10.1016/S1072-7515(03)00230-8.

Savage, Jesse J., Benjamin C. Yaden, Parinda Kiratipranon, et Simon J. Rhodes. 2003. « Transcriptional Control during Mammalian Anterior Pituitary Development ». *Gene* 319 (novembre): 1-19.

Schewe, Denis M., et Julio A. Aguirre-Ghiso. 2008. « ATF6?-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (30): 10519-24. doi:10.1073/pnas.0800939105.

———. 2009. « Inhibition of eIF2α Dephosphorylation Maximizes Bortezomib Efficiency and Eliminates Quiescent Multiple Myeloma Cells Surviving Proteasome Inhibitor Therapy ». *Cancer Research* 69 (4): 1545-52. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3858.

Schmid, Herbert A., et Philippe Schoeffter. 2004. « Functional Activity of the Multiligand Analog SOM230 at Human Recombinant Somatostatin Receptor Subtypes Supports Its Usefulness in Neuroendocrine Tumors ». *Neuroendocrinology* 80 Suppl 1: 47-50. doi:10.1159/000080741.

Schöber, C., E. Schmoll, H. J. Schmoll, H. Poliwoda, F. Schuppert, M. Stahl, C. Bokemeyer, H. Wilke, et J. Weiss. 1992. « Antitumour Effect and Symptomatic Control with Interferon Alpha 2b in Patients with Endocrine Active Tumours ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 28A (10): 1664-66.

Schonhoff, Susan E., Maryann Giel-Moloney, et Andrew B. Leiter. 2004. « Minireview: Development and Differentiation of Gut Endocrine Cells ». *Endocrinology* 145 (6): 2639-44. doi:10.1210/en.2004-0051.

Scoazec, Jean-Yves. 2005. « [Endocrine tumors: biology and physiopathology] ». *Annales De Pathologie* 25 (6): 447-61.

———. 2013. « Angiogenesis in Neuroendocrine Tumors: Therapeutic Applications ». *Neuroendocrinology* 97 (1): 45-56. doi:10.1159/000338371.

Sequeira, Sharon J., Aparna C. Ranganathan, Alejandro P. Adam, Bibiana V. Iglesias, Eduardo F. Farias, et Julio A. Aguirre-Ghiso. 2007. « Inhibition of Proliferation by PERK Regulates Mammary Acinar Morphogenesis and Tumor Formation ». *PLoS ONE* 2 (7). doi:10.1371/journal.pone.0000615.

Serri, O., P. Brazeau, Z. Kachra, et B. Posner. 1992. « Octreotide Inhibits Insulin-like Growth Factor-I Hepatic Gene Expression in the Hypophysectomized Rat: Evidence for a Direct and Indirect Mechanism of Action ». *Endocrinology* 130 (4): 1816-21. doi:10.1210/endo.130.4.1547711.

Sfanos, Karen S., Tullia C. Bruno, Alan K. Meeker, Angelo M. De Marzo, William B. Isaacs, et Charles G. Drake. 2009. « Human Prostate-Infiltrating CD8+ T Lymphocytes Are Oligoclonal and PD-1+ ». *The Prostate* 69 (15): 1694-1703. doi:10.1002/pros.21020.

Shah, Manisha H., Donn Young, Hedy L. Kindler, Iain Webb, Barbara Kleiber, John Wright, et Michael Grever. 2004. « Phase II Study of the Proteasome Inhibitor Bortezomib (PS-341) in Patients with Metastatic Neuroendocrine Tumors ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 10 (18 Pt 1): 6111-18. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0422.

Shani, Gidi, Wolfgang H. Fischer, Nicholas J. Justice, Jonathan A. Kelber, Wylie Vale, et Peter C. Gray. 2008. « GRP78 and Cripto Form a Complex at the Cell Surface and Collaborate To Inhibit Transforming Growth Factor β Signaling and Enhance Cell Growth ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (2): 666-77. doi:10.1128/MCB.01716-07.

Sharma, K., et C. B. Srikant. 1998. « Induction of Wild-Type p53, Bax, and Acidic Endonuclease during Somatostatin-Signaled Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells ». *International Journal of Cancer* 76 (2): 259-66.

Shaw, R. J. 2009. « LKB1 and AMP-Activated Protein Kinase Control of mTOR Signalling and Growth ». *Acta Physiologica (Oxford, England)* 196 (1): 65-80. doi:10.1111/j.1748-1716.2009.01972.x.

Shen, Jingshi, Xi Chen, Linda Hendershot, et Ron Prywes. 2002. « ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals ». *Developmental Cell* 3 (1): 99-111.

Shi, Shaomin, Ping Tan, Bingdi Yan, Rong Gao, Jianjun Zhao, Jing Wang, Jia Guo, Ning Li, et Zhongsen Ma. 2016. « ER Stress and Autophagy Are Involved in the Apoptosis Induced by Cisplatin in Human Lung Cancer Cells ». *Oncology Reports* 35 (5): 2606-14. doi:10.3892/or.2016.4680.

Shimobayashi, Mitsugu, et Michael N. Hall. 2014. « Making New Contacts: The mTOR Network in Metabolism and Signalling Crosstalk ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (3): 155-62. doi:10.1038/nrm3757.

Shojamanesh, Homayoun, Fathia Gibril, Adeline Louie, Jeremiah V. Ojeaburu, Showkat Bashir, Alaa Abou-Saif, et Robert T. Jensen. 2002. « Prospective Study of the Antitumor Efficacy of Long-Term Octreotide Treatment in Patients with Progressive Metastatic Gastrinoma ». *Cancer* 94 (2): 331-43. doi:10.1002/cncr.10195.

Shoulders, Matthew D., Lisa M. Ryno, Joseph C. Genereux, James J. Moresco, Patricia G. Tu, Chunlei Wu, John R. Yates, Andrew I. Su, Jeffery W. Kelly, et R. Luke Wiseman. 2013. « Stress-Independent Activation of XBP1s and/or ATF6 Reveals Three Functionally Diverse ER Proteostasis Environments ». *Cell reports* 3 (4): 1279-92. doi:10.1016/j.celrep.2013.03.024.

Shuda, Masahiro, Nobuo Kondoh, Nobuo Imazeki, Kenji Tanaka, Tetsuya Okada, Kazutoshi Mori, Akiyuki Hada, et al. 2003. « Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 Genes in Human Hepatocellular Carcinoma: A Possible Involvement of the ER Stress Pathway in Hepatocarcinogenesis ». *Journal of Hepatology* 38 (5): 605-14. doi:10.1016/S0168-8278(03)00029-1.

Sidrauski, Carmela, Anna M. McGeachy, Nicholas T. Ingolia, et Peter Walter. 2015. « The Small Molecule ISRIB Reverses the Effects of eIF2α Phosphorylation on Translation and Stress Granule Assembly ». *eLife* 4 (février). doi:10.7554/eLife.05033.

Smith, James, et Diane Reidy-Lagunes. 2013. « The Management of Extrapulmonary Poorly Differentiated (High-Grade) Neuroendocrine Carcinomas ». *Seminars in Oncology* 40 (1): 100-108. doi:10.1053/j.seminoncol.2012.11.011.

Sobin, L. H., M. K. Gospodarowicz, Ch Wittekind, et International Union against Cancer, éd. 2010. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 7th ed. 2009. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.

Solcia, Enrico, Günter Klöppel, L. H. Sobin, et E. D. Williams. 2000. *Histological Typing of Endocrine Tumours*. 2nd ed. International Histological Classification of Tumours. Berlin ; New York: Springer.

Sorbye, H., S. Welin, S. W. Langer, L. W. Vestermark, N. Holt, P. Osterlund, S. Dueland, et al. 2013. « Predictive and Prognostic Factors for Treatment and Survival in 305 Patients with Advanced Gastrointestinal Neuroendocrine Carcinoma (WHO G3): The NORDIC NEC Study ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 24 (1): 152-60. doi:10.1093/annonc/mds276.

Sorbye, Halfdan, Jonathan Strosberg, Eric Baudin, David S. Klimstra, et James C. Yao. 2014. « Gastroenteropancreatic High-Grade Neuroendocrine Carcinoma ». *Cancer* 120 (18): 2814-23. doi:10.1002/cncr.28721.

Stein, I., M. Neeman, D. Shweiki, A. Itin, et E. Keshet. 1995. « Stabilization of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA by Hypoxia and Hypoglycemia and Coregulation with Other Ischemia-Induced Genes ». *Molecular and Cellular Biology* 15 (10): 5363-68.

Strosberg, Jonathan. 2012. « Neuroendocrine Tumours of the Small Intestine ». *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* 26 (6): 755-73. doi:10.1016/j.bpg.2012.12.002.

Sun, Shi-Yong, Laura M. Rosenberg, Xuerong Wang, Zhongmei Zhou, Ping Yue, Haian Fu, et Fadlo R. Khuri. 2005. « Activation of Akt and eIF4E Survival Pathways by Rapamycin-Mediated Mammalian Target of Rapamycin Inhibition ». *Cancer Research* 65 (16): 7052-58. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0917.

Susanti, Siti, Hironori Iwasaki, Masashi Inafuku, Naoyuki Taira, et Hirosuke Oku. 2013. « Mechanism of Arctigenin-Mediated Specific Cytotoxicity against Human Lung Adenocarcinoma Cell Lines ». *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 21 (1): 39-46. doi:10.1016/j.phymed.2013.08.003.

Takahashi, Yu, Yuri Akishima-Fukasawa, Noritoshi Kobayashi, Tsuyoshi Sano, Tomoo Kosuge, Yuji Nimura, Yae Kanai, et Nobuyoshi Hiraoka. 2007. « Prognostic Value of Tumor Architecture, Tumor-Associated Vascular Characteristics, and Expression of Angiogenic Molecules in Pancreatic Endocrine Tumors ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13 (1): 187-96. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1408.

Tan, Shaun S., Imran Ahmad, Haley L. Bennett, Lukram Singh, Colin Nixon, Morag Seywright, Robert J. Barnetson, Joanne Edwards, et Hing Y. Leung. 2011. « GRP78 up-Regulation Is Associated with Androgen Receptor Status, Hsp70-Hsp90 Client Proteins and Castrate-Resistant Prostate Cancer ». *The Journal of Pathology* 223 (1): 81-87. doi:10.1002/path.2795.

Tang, Chih-Hang Anthony, Sujeewa Ranatunga, Crystina L. Kriss, Christopher L. Cubitt, Jianguo Tao, Javier A. Pinilla-Ibarz, Juan R. Del Valle, et Chih-Chi Andrew Hu. 2014. « Inhibition of ER Stress-Associated IRE-1/XBP-1 Pathway Reduces Leukemic Cell Survival ». *The Journal of Clinical Investigation* 124 (6): 2585-98. doi:10.1172/JCI73448.

Teicher, B. A. 1995. « Physiologic Mechanisms of Therapeutic Resistance. Blood Flow and Hypoxia ». *Hematology/Oncology Clinics of North America* 9 (2): 475-506.

Tenkerian, Clara, Jothilatha Krishnamoorthy, Zineb Mounir, Urszula Kazimierczak, Arkady Khoutorsky, Kirk A. Staschke, Arnold S. Kristof, Shuo Wang, Maria Hatzoglou, et Antonis E. Koromilas. 2015. « mTORC2 Balances AKT Activation and eIF2α Serine 51 Phosphorylation to Promote Survival under Stress ». *Molecular Cancer Research: MCR* 13 (10): 1377-88. doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0184-T.

Teodoro, Tracy, Tanya Odisho, Elena Sidorova, et Allen Volchuk. 2012. « Pancreatic β-Cells Depend on Basal Expression of Active ATF6α-p50 for Cell Survival Even under Nonstress Conditions ». *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 302 (7): C992-1003. doi:10.1152/ajpcell.00160.2011.

Terris, Scoazec, Rubbia, Bregeaud, Pepper, Ruszniewski, Belghiti, FLÉjou, et Degott. 1998. « Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Digestive Neuroendocrine Tumours ». *Histopathology* 32 (2): 133-38. doi:10.1046/j.1365-2559.1998.00321.x.

Thakker, Rajesh V. 2014. « Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and type 4 (MEN4) ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 386 (1-2): 2-15. doi:10.1016/j.mce.2013.08.002.

« Thésaurus National de Cancérologie Digestive ». 2016. Consulté le septembre 6. www.tncd.org.

Thornton, Michael, Mohammed A. Aslam, Elizabeth M. Tweedle, Chin Ang, Fiona Campbell, Richard Jackson, Eithne Costello, Paul S. Rooney, Nikolina Vlatković, et Mark T. Boyd. 2013. « The Unfolded Protein Response Regulator GRP78 Is a Novel Predictive Biomarker in Colorectal Cancer ». *International Journal of Cancer* 133 (6): 1408-18. doi:10.1002/ijc.28137.

Thorpe, Jeffery A., et Steven R. Schwarze. 2010. « IRE1alpha Controls Cyclin A1 Expression and Promotes Cell Proliferation through XBP-1 ». *Cell Stress & Chaperones* 15 (5): 497-508. doi:10.1007/s12192-009-0163-4.

Tirasophon, Witoon, Ajith A. Welihinda, et Randal J. Kaufman. 1998. « A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells ». *Genes & Development* 12 (12): 1812-24.

Tyagi, Richa, Neelam Shahani, Lindsay Gorgen, Max Ferretti, William Pryor, Po Yu Chen, Supriya Swarnkar, et al. 2015. « Rheb Inhibits Protein Synthesis by Activating the PERK-eIF2α Signaling Cascade ». *Cell Reports*, février. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.014.

Tzivion, Guri, Melissa Dobson, et Gopalakrishnan Ramakrishnan. 2011. « FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, PI3K-AKT-FoxO axis in Cancer and Aging, 1813 (11): 1938-45. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.06.002.

Upton, John-Paul, Likun Wang, Dan Han, Eric S. Wang, Noelle E. Huskey, Lionel Lim, Morgan Truitt, et al. 2012. « IRE1α Cleaves Select microRNAs during ER Stress to Derepress Translation of Proapoptotic Caspase-2 ». *Science (New York, N.Y.)* 338 (6108): 818-22. doi:10.1126/science.1226191.

Urano, F., X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H. P. Harding, et D. Ron. 2000. « Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1 ». *Science (New York, N.Y.)* 287 (5453): 664-66.

Vandamme, Timon, Matthias Beyens, Ken Op de Beeck, Fadime Dogan, Peter M. van Koetsveld, Patrick Pauwels, Geert Mortier, et al. 2016. « Long-Term Acquired Everolimus Resistance in Pancreatic Neuroendocrine Tumours Can Be Overcome with Novel PI3K-AKT-mTOR Inhibitors ». *British Journal of Cancer* 114 (6): 650-58. doi:10.1038/bjc.2016.25.

Vaupel, Peter, Friedrich Kallinowski, et Paul Okunieff. 1989. « Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review ». *Cancer Research* 49 (23): 6449-65.

Vezzosi, Delphine, Thomas Walter, Agnès Laplanche, Jean Luc Raoul, Clarisse Dromain, Philippe Ruszniewski, Michèle d'Herbomez, et al. 2011. « Chromogranin A Measurement in Metastatic Well-Differentiated Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Carcinoma: Screening for False Positives and a Prospective Follow-up Study ». *The International Journal of Biological Markers* 26 (2): 94-101. doi:10.5301/JBM.2011.8327.

Villaume, Karine, Martine Blanc, Géraldine Gouysse, Thomas Walter, Christophe Couderc, Mimoun Nejjari, Cécile Vercherat, Martine Cordier-Bussat, Colette Roche, et Jean-Yves Scoazec. 2010. « VEGF Secretion by Neuroendocrine Tumor Cells Is Inhibited by Octreotide and by Inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR Pathway ». *Neuroendocrinology* 91 (3): 268-78. doi:10.1159/000289569.

Vinik, Aaron, Andrew Bottomley, Beata Korytowsky, Yung-Jue Bang, Jean-Luc Raoul, Juan W. Valle, Peter Metrakos, et al. 2016. « Patient-Reported Outcomes and Quality of Life with Sunitinib Versus Placebo for Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Results From an International Phase III Trial ». *Targeted Oncology* 11 (6): 815-24. doi:10.1007/s11523-016-0462-5.

Waldherr, C., M. Pless, H. R. Maecke, A. Haldemann, et J. Mueller-Brand. 2001. « The Clinical Value of [90Y-DOTA]-D-Phe1-Tyr3-Octreotide (90Y-DOTATOC) in the Treatment of Neuroendocrine Tumours: A Clinical Phase II Study ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 12 (7): 941-45.

Wallace, M. R., D. A. Marchuk, L. B. Andersen, R. Letcher, H. M. Odeh, A. M. Saulino, J. W. Fountain, A. Brereton, J. Nicholson, et A. L. Mitchell. 1990. « Type 1 Neurofibromatosis Gene: Identification of a Large Transcript Disrupted in Three NF1 Patients ». *Science (New York, N.Y.)* 249 (4965): 181-86.

Walter, Peter, et David Ron. 2011. « The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation ». *Science* 334 (6059): 1081-86. doi:10.1126/science.1209038.

Walter, Thomas, et Catherine Lombard-Bohas. 2011. « Effet antitumoral des analogues de la somatostatine dans les tumeurs endocrines digestives ». *Hépato-Gastro & Oncologie Digestive* 18 (3): 289-95. doi:10.1684/hpg.2011.0590.

Walter, Thomas, Jean-Yves Scoazec, et Côme Lepage. 2013. « Épidémiologie des tumeurs neuroendocrines digestives : la situation en France ». *Hépato-Gastro & Oncologie Digestive* 20 (3): 160-66. doi:10.1684/hpg.2013.0852.

Walter, Thomas, David Tougeron, Eric Baudin, Karine Le Malicot, Thierry Lecomte, Joel Guigay, Olivia Hentic, et al. 2015. « Characteristics, prognosis and treatments of 294 patients with poorly differentiated neuroendocrine carcinoma: The FFCD-GTE national cohort ». *Journal of Clinical Oncology* 33 (suppl; abstr 4095). http://meetinglibrary.asco.org/content/147906-156.

Wang, Feng-Ming, et Hong-Jiao Ouyang. 2011. « Regulation of unfolded protein response modulator XBP1s by acetylation and deacetylation ». *The Biochemical journal* 433 (1): 245-52. doi:10.1042/BJ20101293.

Wang, Miao, et Randal J. Kaufman. 2014. « The Impact of the Endoplasmic Reticulum Protein-Folding Environment on Cancer Development ». *Nature Reviews Cancer* 14 (9): 581-97. doi:10.1038/nrc3800.

Wang, Sui, Jan N. Jensen, Philip A. Seymour, Wei Hsu, Yuval Dor, Maike Sander, Mark A. Magnuson, Palle Serup, et Guoqiang Gu. 2009. « Sustained Neurog3 Expression in Hormone-Expressing Islet Cells Is Required for Endocrine Maturation and Function ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (24): 9715-20. doi:10.1073/pnas.0904247106.

Wang, X. Z., et D. Ron. 1996. « Stress-Induced Phosphorylation and Activation of the Transcription Factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase ». *Science (New York, N.Y.)* 272 (5266): 1347-49.

Wang, Yugang, Goleeta N. Alam, Yu Ning, Fernanda Visioli, Zhihong Dong, Jacques E. Nor, et Peter J. Polverini. 2012. « The Unfolded Protein Response Induces the Angiogenic Switch in Human Tumor Cells through the PERK/ATF4 Pathway ». *Cancer research* 72 (20): 5396-5406. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0474.

Wang, Yugang, Yu Ning, Goleeta N. Alam, Brandon M. Jankowski, Zhihong Dong, Jacques E. Nör, et Peter J. Polverini. 2013. « Amino Acid Deprivation Promotes Tumor Angiogenesis through the GCN2/ATF4 Pathway ». *Neoplasia (New York, N.Y.)* 15 (8): 989-97.

Weckbecker, Gisbert, Ian Lewis, Rainer Albert, Herbert A. Schmid, Daniel Hoyer, et Christian Bruns. 2003. « Opportunities in Somatostatin Research: Biological, Chemical and Therapeutic Aspects ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 2 (12): 999-1017. doi:10.1038/nrd1255.

Wek, R. C., M. Ramirez, B. M. Jackson, et A. G. Hinnebusch. 1990. « Identification of Positive-Acting Domains in GCN2 Protein Kinase Required for Translational Activation of GCN4 Expression ». *Molecular and Cellular Biology* 10 (6): 2820-31.

Wek, Ronald C., et Douglas R. Cavener. 2007. « Translational Control and the Unfolded Protein Response ». *Antioxidants & Redox Signaling* 9 (12): 2357-71. doi:10.1089/ars.2007.1764.

Wek, S. A., S. Zhu, et R. C. Wek. 1995. « The Histidyl-tRNA Synthetase-Related Sequence in the eIF-2 Alpha Protein Kinase GCN2 Interacts with tRNA and Is Required for Activation in Response to Starvation for Different Amino Acids ». *Molecular and Cellular Biology* 15 (8): 4497-4506.

Welin, Staffan V., Eva Tiensuu Janson, Anders Sundin, Mats Stridsberg, Erik Lavenius, Dan Granberg, Britt Skogseid, Kjell E. Oberg, et Barbro K. Eriksson. 2004. « High-Dose Treatment with a

Long-Acting Somatostatin Analogue in Patients with Advanced Midgut Carcinoid Tumours ». *European Journal of Endocrinology* 151 (1): 107-12.

Wiedenmann, Bertram, et Wieland B. Huttner. 1989. « Synaptophysin and Chromogranins/Secretogranins Widespread Constituents of Distinct Types of Neuroendocrine Vesicles and New Tools in Tumor Diagnosis ». *Virchows Archiv B* 58 (1): 95-121. doi:10.1007/BF02890062.

Wilhelm, Scott M., Christopher Carter, Liya Tang, Dean Wilkie, Angela McNabola, Hong Rong, Charles Chen, et al. 2004. « BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF/MEK/ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis ». *Cancer Research* 64 (19): 7099-7109. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1443.

Wolin, Edward M., Ke Hu, Gareth Hughes, Emmanuel Bouillaud, Vanessa Giannone, et Karina Hermosillo Resendiz. 2013. « Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of a long-acting release (LAR) formulation of pasireotide (SOM230) in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: results from a randomized, multicenter, open-label, phase I study ». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 72 (2): 387-95. doi:10.1007/s00280-013-2202-1.

Wolin, Edward M., Barbara Jarzab, Barbro Eriksson, Thomas Walter, Christos Toumpanakis, Michael A. Morse, Paola Tomassetti, et al. 2015. « Phase III Study of Pasireotide Long-Acting Release in Patients with Metastatic Neuroendocrine Tumors and Carcinoid Symptoms Refractory to Available Somatostatin Analogues ». *Drug Design, Development and Therapy* 9: 5075-86. doi:10.2147/DDDT.S84177.

Woltering, E. A., J. C. Watson, R. C. Alperin-Lea, C. Sharma, E. Keenan, D. Kurozawa, et R. Barrie. 1997. « Somatostatin Analogs: Angiogenesis Inhibitors with Novel Mechanisms of Action ». *Investigational New Drugs* 15 (1): 77-86.

Wouters, Bradly G., et Marianne Koritzinsky. 2008. « Hypoxia Signalling through mTOR and the Unfolded Protein Response in Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 8 (11): 851-64. doi:10.1038/nrc2501.

Wullschleger, Stephan, Robbie Loewith, et Michael N. Hall. 2006. « TOR Signaling in Growth and Metabolism ». *Cell* 124 (3): 471-84. doi:10.1016/j.cell.2006.01.016.

Yachida, Shinichi, Efsevia Vakiani, Catherine M. White, Yi Zhong, Tyler Saunders, Richard Morgan, Roeland F. de Wilde, et al. 2012. « Small Cell and Large Cell Neuroendocrine Carcinomas of the Pancreas Are Genetically Similar and Distinct from Well-differentiated Pancreatic Neuroendocrine Tumors ». *The American Journal of Surgical Pathology* 36 (2): 173-84. doi:10.1097/PAS.0b013e3182417d36.

Yamamoto, Keisuke, Hiderou Yoshida, Koichi Kokame, Randal J. Kaufman, et Kazutoshi Mori. 2004. « Differential Contributions of ATF6 and XBP1 to the Activation of Endoplasmic Reticulum Stress-Responsive Cis-Acting Elements ERSE, UPRE and ERSE-II ». *Journal of Biochemistry* 136 (3): 343-50. doi:10.1093/jb/mvh122.

Yao, James C., Nicola Fazio, Simron Singh, Roberto Buzzoni, Carlo Carnaghi, Edward Wolin, Jiri Tomasek, et al. 2016. « Everolimus for the Treatment of Advanced, Non-Functional Neuroendocrine Tumours of the Lung or Gastrointestinal Tract (RADIANT-4): A Randomised, Placebo-Controlled, Phase 3 Study ». *Lancet (London, England)* 387 (10022): 968-77. doi:10.1016/S0140-6736(15)00817-X.

Yao, James C., Manal Hassan, Alexandria Phan, Cecile Dagohoy, Colleen Leary, Jeannette E. Mares, Eddie K. Abdalla, et al. 2008. « One Hundred Years After “carcinoid”: Epidemiology of and Prognostic Factors for Neuroendocrine Tumors in 35,825 Cases in the United States ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (18): 3063-72. doi:10.1200/JCO.2007.15.4377.

Yao, James C., Catherine Lombard-Bohas, Eric Baudin, Larry K. Kvols, Philippe Rougier, Philippe Ruszniewski, Sakina Hoosen, et al. 2010. « Daily Oral Everolimus Activity in Patients With Metastatic Pancreatic Neuroendocrine Tumors After Failure of Cytotoxic Chemotherapy: A Phase II Trial ». *Journal of Clinical Oncology* 28 (1): 69-76. doi:10.1200/JCO.2009.24.2669.

Yao, James C., Alexandria Phan, Paulo M. Hoff, Helen X. Chen, Chusilp Charnsangavej, Sai-Ching J. Yeung, Kenneth Hess, Chaan Ng, James L. Abbruzzese, et Jaffer A. Ajani. 2008. « Targeting Vascular Endothelial Growth Factor in Advanced Carcinoid Tumor: A Random Assignment Phase II Study of Depot Octreotide with Bevacizumab and Pegylated Interferon Alpha-2b ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (8): 1316-23. doi:10.1200/JCO.2007.13.6374.

Yao, James C., Manisha H. Shah, Tetsuhide Ito, Catherine Lombard Bohas, Edward M. Wolin, Eric Van Cutsem, Timothy J. Hobday, et al. 2011. « Everolimus for Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors ». *The New England journal of medicine* 364 (6): 514-23. doi:10.1056/NEJMoa1009290.

Ye, J., R. B. Rawson, R. Komuro, X. Chen, U. P. Davé, R. Prywes, M. S. Brown, et J. L. Goldstein. 2000. « ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases That Process SREBPs ». *Molecular Cell* 6 (6): 1355-64.

Ye, Jiangbin, Monika Kumanova, Lori S. Hart, Kelly Sloane, Haiyan Zhang, Diego N. De Panis, Ekaterina Bobrovnikova-Marjon, J. Alan Diehl, David Ron, et Constantinos Koumenis. 2010. « The GCN2-ATF4 Pathway Is Critical for Tumour Cell Survival and Proliferation in Response to Nutrient Deprivation ». *The EMBO Journal* 29 (12): 2082-96. doi:10.1038/emboj.2010.81.

Yoneda, T., K. Imaizumi, K. Oono, D. Yui, F. Gomi, T. Katayama, et M. Tohyama. 2001. « Activation of Caspase-12, an Endoplastic Reticulum (ER) Resident Caspase, through Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 2-Dependent Mechanism in Response to the ER Stress ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (17): 13935-40. doi:10.1074/jbc.M010677200.

Yoshida, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada, et K. Mori. 2001. « XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor ». *Cell* 107 (7): 881-91.

Yoshida, Hiderou. 2007. « Unconventional Splicing of XBP-1 mRNA in the Unfolded Protein Response ». *Antioxidants & Redox Signaling* 9 (12): 2323-33. doi:10.1089/ars.2007.1800.

Yoshida, Hiderou, Masaya Oku, Mie Suzuki, et Kazutoshi Mori. 2006. « pXBP1(U) Encoded in XBP1 Pre-mRNA Negatively Regulates Unfolded Protein Response Activator pXBP1(S) in Mammalian ER Stress Response ». *The Journal of Cell Biology* 172 (4): 565-75. doi:10.1083/jcb.200508145.

Yu, Ker, Celine Shi, Lourdes Toral-Barza, Judy Lucas, Boris Shor, Jae Eun Kim, Wei-Guo Zhang, et al. 2010. « Beyond Rapalog Therapy: Preclinical Pharmacology and Antitumor Activity of WYE-125132, an ATP-Competitive and Specific Inhibitor of mTORC1 and mTORC2 ». *Cancer Research* 70 (2): 621-31. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2340.

Zhang, Kezhong, Hetty N. Wong, Benbo Song, Corey N. Miller, Donalyn Scheuner, et Randal J. Kaufman. 2005. « The Unfolded Protein Response Sensor IRE1alpha Is Required at 2 Distinct

Steps in B Cell Lymphopoiesis ». *The Journal of Clinical Investigation* 115 (2): 268-81. doi:10.1172/JCI21848.

Zhang, Peichuan, Barbara C. McGrath, Jamie Reinert, DeAnne S. Olsen, Li Lei, Sangeeta Gill, Sheree A. Wek, et al. 2002. « The GCN2 eIF2α Kinase Is Required for Adaptation to Amino Acid Deprivation in Mice ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (19): 6681-88. doi:10.1128/MCB.22.19.6681-6688.2002.

Zhang, Yan, Shengdong Huang, Dejun Gong, Yanghua Qin, et Qian Shen. 2010. « Programmed Death-1 Upregulation Is Correlated with Dysfunction of Tumor-Infiltrating CD8+ T Lymphocytes in Human Non-Small Cell Lung Cancer ». *Cellular & Molecular Immunology* 7 (5): 389-95. doi:10.1038/cmi.2010.28.

Zheng, Min, Yan-Hai Wang, Xiao-Nan Wu, Su-Qin Wu, Bao-Ju Lu, Meng-Qiu Dong, Hongbing Zhang, et al. 2011. « Inactivation of Rheb by PRAK-Mediated Phosphorylation Is Essential for Energy-Depletion-Induced Suppression of mTORC1 ». *Nature Cell Biology* 13 (3): 263-72. doi:10.1038/ncb2168.

Zinzalla, Vittoria, Daniele Stracka, Wolfgang Oppliger, et Michael N. Hall. 2011. « Activation of mTORC2 by Association with the Ribosome ». *Cell* 144 (5): 757-68. doi:10.1016/j.cell.2011.02.014.

Zitzmann, Kathrin, Janina von Rüden, Stephan Brand, Burkhard Göke, Jennifer Lichtl, Gerald Spöttl, et Christoph J. Auernhammer. 2010. « Compensatory Activation of Akt in Response to mTOR and Raf Inhibitors - a Rationale for Dual-Targeted Therapy Approaches in Neuroendocrine Tumor Disease ». *Cancer Letters* 295 (1): 100-109. doi:10.1016/j.canlet.2010.02.018.

Zoncu, Roberto, Alejo Efeyan, et David M. Sabatini. 2011. « mTOR: From Growth Signal Integration to Cancer, Diabetes and Ageing ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (1): 21-35. doi:10.1038/nrm3025.

ANNEXE

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Prognostic factors in neuroendocrine carcinoma: biological markers are more useful than histomorphological markers

Received: 13 September 2016
Accepted: 07 December 2016
Published: 11 January 2017

Patricia Freis[1,2,3], Emmanuelle Graillot[4], Pascal Rousset[5], Valérie Hervieu[1], Laurence Chardon[6], Catherine Lombard-Bohas[4] & Thomas Walter[2,4]

Gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinomas (GEP-NEC) are a very aggressive type of cancer, for which prognostic factors are lacking. We analysed clinical and histomorphological prognostic markers of overall survival (OS), completed with a record of biological and haematological data of patients diagnosed between December 2002 and December 2015. The median OS was 16 months (95% CI 13.9–18.1). After univariate analysis, performance status (PS) ≥ 2 and stage IV were associated with a worse outcome (9 months and 14 months, respectively), as well as patients with lactate dehydrogenase (LDH) and aspartate aminotransferase (AST) levels ≥ 2 ULN (9 months and 8 months, respectively). After multivariate analysis, LDH and AST levels were the only factors that remained significantly associated with better survival: HR 0.36 ($p = 0.04$) and 0.31 ($p = 0.03$), respectively. When patients had elevated LDH and AST levels, OS was 20 months, when they had high LDH or AST levels, 13 months and 8 months in the group with low LDH and AST levels ($p < 0.001$). Therefore, biological data appeared to be more relevant prognostic factors than usual factors described in other studies (PS, stage, and Ki-67). Considering LDH and AST levels at diagnosis could help physicians to predict survival and to stratify patients for clinical trials.

Gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinomas (GEP-NEC) represent less than 1% of digestive cancers and 7 to 21% of neuroendocrine neoplasms[1]. In the 2010 World Health Organisation (WHO) classification, NEC are defined as poorly differentiated tumours, with small or large cells, expressing neuroendocrine markers chromogranin A (CgA) and synaptophysin, and with a high proliferative index (grade 3 with a Ki-67 > 20%). NEC prognosis is poor, as patients usually present with metastatic disease at diagnosis (more than 80% of patients) and because of the relative lack of effective therapy. Prognosis varies according to disease stage at diagnosis. Based on Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) data for 2546 patients with gastrointestinal NEC, Sorbye *et al.* evaluated that the median survival of patients with localized disease was 38 months, of those with regional disease 16 months, and of those with distant disease 5 months[2]. To date, prognostic survival factors have rarely been explored in NEC. Some authors have investigated biological data for use as prognostic factors in neuroendocrine tumour (NET) and NEC patients, and these have included lactate dehydrogenase (LDH)[3,4], CgA[3,4], neuron-specific enolase (NSE)[4], platelets, haemoglobin, white blood cell count, alkaline phosphatase (ALP), and C-reactive protein (CRP)[3]. Several studies in other aggressive types of cancer have described biological characteristics as prognostic tools, such as LDH and ALP levels in small cell lung cancer[5,6], or neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in biliary tract and gastric cancers[7,8]. Recent studies have also reported the potential of blood transcript analysis as a predictive and prognostic marker of progression in well-differentiated NET[9,10], but this was not studied in NEC patients. Moreover, molecular analysis, such as p53 and retinoblastoma (RB) protein staining, are

[1]Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Service Central d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, 69437 Lyon cedex 03, France. [2]University of Lyon, Université Lyon 1, France. [3]Equipe Signalisation de l'Immunité Innée et Oncogénèse, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, UMR Inserm 1052 CNRS 5286, 69373 Lyon cedex 08, France. [4]Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Service de Gastroentérologie et d'Oncologie Digestive, 69437 Lyon cedex 03, France. [5]Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Radiologie, 69437 Lyon cedex 03, France. [6]Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Service de Biochimie, 69437 Lyon cedex 03, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.F. (email: patricia.freis@inserm.fr)

probably promising in NEC[11], but these analyses are not validated for survival prognosis in NEC. In this context, we conducted a retrospective study to evaluate usual relevant clinical and histomorphological prognostic markers of overall survival in patients with NEC, completed with biological and haematological data, which are convenient and directly available to physicians.

Results

Patient characteristics. A total of 109 patients referred to the Edouard Herriot hospital (Lyon, France) between 2002 and 2015 for GEP-NEC were identified. Nine patients were excluded because of well-differentiated NET (n = 6) or because their medical file was not available (n = 3). Therefore, 100 patients were included in the study.

The median age at diagnosis was 64 years (mean 63 years, range 30–89 years) and 67% were male. The most frequent primary tumour locations were: duodenum-pancreas (30%), colon-rectum (26%), unknown location (24%), and oesophagus-stomach (15%). Among the symptoms at diagnosis pain (57%) and weight loss (40%) were common features, whereas bowel disorders (20%), icterus (13%), and mass syndrome (6%) were less frequently reported. Thirty-one percent had an Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG-PS) ≥ 2. Only 1 patient presented a functioning tumour with adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion. The majority of patients had stage IV disease (81%), defined by the presence of at least 1 metastatic site. The most common metastatic sites were the liver (56%) and distant lymph nodes (50%). Somatostatin Receptor Scintigraphy (SRS) was performed in 24 patients (24% of the population), and was positive in 48% of these; fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) was performed in 46 patients (46% of the population) and was positive in 91% of these. Primary tumour resection was performed in 28% of the population (Table 1), and 42% of them presented a stage I-III tumour. All patients received standard chemotherapy regimens for NEC (cisplatin or carboplatin with etoposide), as first-line palliative chemotherapy or in curative intent with surgery or radiotherapy for stage I-III NEC.

Increased ($\geq$2 upper limit of normal, ULN) levels of CgA were found in 41% of the 44 patients with data, increased NSE was found in 59% of the 44 patients with data, and LDH in 29% of the 52 with data. Among the 15 patients with an elevated LDH level (Table 2), 60% presented liver metastasis. The median ALP level was at the ULN. Increased AST levels were found in 19/61 of those with data (31%; Table 2), among whom 89% had liver metastasis. Thirty percent of patients with liver metastasis had an elevated AST level, and only 4% patients without liver metastases had an elevated AST level. The median values for complete blood cell count and coagulation factors (fibrinogen, prothrombin time – PT, activated partial thromboplastin time – aPTT) were normal, although fibrinogen which was near the ULN (Table 2).

Histological analysis was performed on primary tumour site (63%) or on metastatic site (36%). Large cell NEC was the most prevalent morphology (59%). Synaptophysin staining was positive for almost all patients (98%) with data, and CgA staining was positive nearly three-quarters (72%) of those with data. The median level of Ki-67 index was 70% (20–100%). Necrosis status was recorded in 58 patients, and 86% of them were positive (Table 3).

Overall survival and prognostic factors. The median (range) duration of follow-up was 13 (1–91) months and the median overall survival (OS) was 16 months (95% confidence interval – CI 13.9–18.1; Fig. 1a). Among the 66 deceased patients, 63 died of the cancer and 3 had no known cause of death; the cancer specific survival and OS were the same (median of 16.0 months). After univariate analysis, the following clinical, biological, and morphological factors were associated with shorter OS: ECOG-PS ≥ 2, stage IV disease (Table 1), LDH ≥ 2 ULN, and AST ≥ 2 ULN (Table 2). The other factors investigated, such as inflammation markers (low albumin, high CRP, and high NLR ratio) were not prognostic factors. Patients with a Ki-67 $< 55\%$ (median OS: 22 months; 95% CI 10.2–33.8) had a longer OS than patients with a Ki-67 $\geq 55\%$ (median OS: 14 months; 95% CI 12.0–16.0), but this difference was not significant ($p = 0.06$; Table 3). Primary tumour resection was associated with better median OS (25 months, 95% CI 14.1–35.9), compared to non-resected patients (13 months, 95% CI 11.4–14.6; $p = 0.004$; Table 1), but was not included in the multivariate analysis because this treatment is not a prognostic factor present at diagnosis. The metastases resection had no impact on OS (Table 1).

Factors found to be significantly associated with OS in univariate analysis were tested in multivariate analysis, namely ECOG-PS, stage, AST, and LDH levels. As shown in Tables 1 and 2, ECOG-PS data was available for 64 patients, stage data for all patients, AST data for 61, and LDH data for 52 patients. Multivariate analysis was performed on the 39 patients without missing data. Median OS for these patients (15 months, 95% CI 11.9–18.1) was not significantly different to that of the 61 patients with at least one missing data (16 months, 95% CI 12.7–19.3; $p = 0.51$). Cox regression found that elevated LDH (hazard ratio – HR: 0.36, 95% CI 0.13–0.97; $p = 0.04$) and AST (HR: 0.31, 95% CI 0.11–0.91; $p = 0.03$) levels were significantly associated with better survival (Table 4, and Fig. 1b,c). After stratification of patients according to median OS, 3 groups of patients were clearly separated into prognosis groups. The OS was 20 months (95% CI 3.9–36.1) when neither AST or LDH levels were ≥ 2 ULN, 13 months (95% CI 7.6–18.4) when AST or LDH levels were ≥ 2 ULN, and 8 months (95% CI 0.0–19.0) when AST and LDH levels were ≥ 2 ULN ($p < 0.001$; Fig. 1d).

Discussion

The aim of this study was to analyse several prognostic factors in a GEP-NEC cohort, including a review of biological factors in addition to other characteristics already identified at baseline in this tumour type, namely clinical, morphological, and histological factors. Searching for additional prognostic factors is essential in NEC, as clinicians lack tools to identify patients who may have longer survival and therefore may benefit more than one line of treatment and/or inclusion in clinical trials.

In multivariate analysis, adjusting for variables including ECOG-PS and stage, AST and LDH levels independently predicted the OS of patients with NEC. If confirmed by other studies, stratification of patients based

	n (%)	Median OS, months (95% CI)	*P* value
All patients	100 (100)	16 (13.9–18.1)	—
Age at diagnosis (years)[a]	64 (30–89)	—	0.26
Gender: male	67 (67)	—	0.74
Primary tumour location (n = 100)			0.88
Unknown	24 (24)	15 (11.9–18.1)	
Oesophagus	4 (4)	16 (0.0–38.5)	
Stomach	11 (11)	16 (3.6–28.4)	
Duodenum	7 (7)	14 (0.0–28.4)	
Pancreas	23 (23)	19 (12.3–25.7)	
Jejunum	1 (1)	11 (−)	
Colon	10 (10)	12 (3.2–20.8)	
Rectum	16 (16)	16 (3.5–28.5)	
Anal canal	2 (2)	18 (−)	
Other[b]	2 (2)	16 (11.7–20.3)	
Clinical symptoms at diagnosis (n = 89)			
Pain	51 (57)	—	0.96
Weight loss	36 (40)	—	0.52
Bowel disorders	18 (20)	—	0.41
Icterus	12 (13)	—	0.16
Mass syndrome	5 (6)	—	0.76
ECOG-PS (n = 64)			0.02
<2	44 (69)	18 (14.0–22.0)	
≥2	20 (31)	9 (7.0–11.0)	
Functioning tumours (n = 94)	1, ACTH (1)	—	0.23
Stage (n = 100)			0.02
I–III (without metastasis)	19 (19)	25 (9.9–40.1)	
IV (with metastasis)	81 (81)	14 (11.5–16.5)	
Number of metastatic sites (n = 100)			0.11
0	19 (19)	25 (9.9–40.1)	
1	42 (42)	14 (12.4–15.6)	
2	22 (22)	12 (0.0–25.4)	
>2	17 (17)	12 (8.5–15.5)	
Location of metastatic sites (n = 100)			
Liver	56 (56)	—	0.11
Lymph nodes	50 (50)	—	0.71
Bone	11 (11)	—	0.99
Lung	11 (11)	—	0.18
Peritoneal	6 (6)	—	0.47
Adrenal gland	4 (4)	—	0.64
Brain	4 (4)	—	0.28
Other[c]	7 (7)	—	0.88
Nuclear imaging			
SRS uptake (n = 24)	11 (48)	—	0.11
FDG-PET uptake (n = 46)	42 (91)	—	0.33
Primary tumour resection (n = 100)			0.004
Yes	28 (28)	25 (14.1–35.9)	
No	72 (72)	13 (11.4–14.6)	
Metastasis resection (n = 100)			0.32
Yes	11 (11)	27 (8.5–45.5)	
No	89 (89)	15 (12.6–17.4)	

Table 1. Clinical data and univariate analysis of overall survival. Abbreviations: ACTH, Adrenocorticotropic hormone; CI, confidance interval; ECOG-PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance status; FDG-PET, fluorodeoxyglucose positron emission tomography; OS, overall survival; SRS, Somatostatin receptor scintigraphy; Notes: [a]Median (range); [b]Other primary tumor sites: appendix (1), gallbladder (1); [c]Other locations of metastasis: kidney (1), muscle (1), cutaneous (2), pancreas (3), thyroid gland (1), breast (1), ovary (1).

	Median (range)	Median OS, months (95% CI)	*P* value
CgA, μg/L (n = 44)	156.5 (20.0–11192.0)	—	0.64
CgA < 2 ULN[a]	26 (59)	16 (14.1–17.9)	0.85
CgA ≥ 2 ULN[a]	18 (41)	14 (9.4–18.6)	
NSE, μg/L (n = 44)	34.1 (6.6–956.1)		0.12
NSE < 2 ULN[a]	18 (41)	17 (13.6–20.4)	0.13
NSE ≥ 2 ULN[a]	26 (59)	13 (8.1–17.9)	
LDH, IU/L (n = 52)	338 (130–2722)	—	0.33
LDH < 2 ULN[a]	37 (71)	19 (13.4–24.6)	<0.001
LDH ≥ 2 ULN[a]	15 (29)	9 (8.0–10.0)	
ALP, IU/L (n = 59)	141 (30–2362)	—	0.64
ALT, IU/L (n = 58)	29 (6–487)	—	0.55
AST, IU/L (n = 61)	29.5 (7.0–376.0)	—	0.58
AST < 2 ULN[a]	42 (69)	18 (13.1–22.9)	0.001
AST ≥ 2 ULN[a]	19 (31)	8 (0.9–15.1)	
Total bilirubin, μmol/L (n = 58)	9.5 (2.0–493.0)	—	0.74
Albumin, g/L (n = 52)	37.9 (20.3–45.0)	—	0.58
CRP, mg/L (n = 53)	18.9 (0.6–224.5)	—	0.29
Fibrinogen, g/L (n = 53)	4.5 (1.9–7.4)	—	0.24
PT, % (n = 55)	96 (20–111)	—	0.29
aPTT, ratio (n = 47)	1.0 (0.8–3.9)	—	0.87
Hb, g/L (n = 63)	126.0 (49.1–159.0)	—	0.86
Leukocytes, G/L (n = 63)	7.4 (2.1–27.2)	—	0.66
Lymphocytes, G/L (n = 61)	1.5 (0.5–6.0)	—	0.10
Neutrophils, G/L (n = 61)	5.5 (0.4–23.9)	—	0.85
Neutrophil/Lymphocyte ratio (n = 61)	3.6 (0.2–21.7)	—	0.16
NLR < 3[a]	23 (38)	16 (8.0–24.0)	0.35
NLR ≥ 3[a]	38 (62)	16 (13.5–18.5)	
NLR < 4[a]	34 (56)	16 (7.7–24.3)	0.06
NLR ≥ 4[a]	27 (44)	16 (13.2–18.8)	
Platelets, G/L (n = 63)	273 (81–816)		0.85

Table 2. Biological data and univariate analysis of overall survival (the cut-off was the median value of each marker or twice the upper limit of normal when specified). Abbreviations: aPTT, activated partial thromboplastin time; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanin aminotransferase; CgA, chromogranin A; CI, confidence interval; CRP, C-reactive protein; Hb, hemoglobin; LDH, lactate dehydrogenase; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; NSE, Neuron-specific enolase; OS, overall survival; PT, prothrombin time, ULN, upper limit of normal; Notes: [a]n (%).

on AST and LDH levels could help physicians to predict survival and separate patients into groups for clinical trials. In the present study, median OS for patients with high AST and LDH levels, high AST or LDH levels, and low AST and LDH levels differed significantly. The NORDIC study, performed in 12 Nordic University Hospitals and 308 eligible patients, also demonstrated that elevated LDH level was a negative prognostic factor[3], as well as a study on 100 colorectal NEC performed in a single cancer centre in Texas[12]. Both studies did not analyse all liver enzymes, as we did in the present study. This is therefore the first report of an association between elevated transaminase and poor prognosis. A high LDH level can be explained by the reliance of tumour cells on increased glycolysis that results in increased lactate production instead of aerobic respiration in the mitochondria, even under oxygen-sufficient conditions (a process also known as the Warburg effect)[13]. As NEC positively respond to FDG-PET they consume large quantities of glucose and therefore produce more lactate than normal cells. Moreover, these tumours are poorly vascularized and highly proliferative[14], two factors that could promote hypoxia within tumours. These conditions (high consumption of glucose and hypoxic environment) lead to higher LDH levels. More generally, a high LDH level is known to be a factor of poor prognosis in other cancers, such as lung[15] and breast cancer[16], and two other studies in NEC (pulmonary[17] and colorectal[12]) also reported high LDH serum levels. Among 61 patients with available AST data at diagnosis, 31% had AST ≥ 2 ULN and they were associated with poorer outcome in multivariate analysis. The rise of AST serum levels is, at least in part, explained by liver involvement as the proportion of patients with high AST levels was 31% among those with liver metastases *versus* 4% in those without liver metastases.

Very recently, one study performed on 149 pancreatic neuroendocrine neoplasms demonstrated that CRP level is a new prognostic factor for survival[18]. This is, to date, the only study that analysed an inflammatory marker as prognostic tool in neuroendocrine neoplasms. The CRP/albumin ratio is also a prognostic factor for survival in small cell lung cancer[19]. Based on these studies, we analysed CRP and albumin levels in the present NEC cohort,

	n (%)	Median OS, months (95% CI)	*P* value
Morphological size (n = 82)			0.79
Small cell	34 (41)	16 (8.5–23.5)	
Large cell	48 (59)	15 (13.0–17.0)	
Synaptophysin staining (n = 81)			0.12
Positive	79 (98)	16 (13.5–18.5)	
Negative	2 (2)	6 (−)	
CgA staining (n = 92)			0.97
Positive	66 (72)	16 (12.8–19.2)	
Negative	26 (28)	13 (10.6–15.4)	
Ki-67 (n = 89)[a]	70 (20–100)	—	0.58
<55%	23 (26)	22 (10.2–33.8)	0.06
≥55%	66 (74)	14 (12.0–16.0)	
Presence of necrosis (n = 58)			0.08
Yes	50 (86)	14 (11.0–17.0)	
No	8 (14)	Not reached	

Table 3. Histological data and univariate analysis of overall survival. Abbreviations: CgA, chromogranin A; CI, confidence interval; OS, overall survival; Notes: [a]Median (range).

however neither CRP nor albumin levels were prognostic factors in this population. The NLR reflects the immune status of patients and a high NLR is associated with poorer survival in biliary tract cancer[8] and in gastric cancer[7]. After analysis of NLR with the two cut-off levels used in other studies, neither a cut-off value of 3 or 4 were prognostic factors in this population. There was a trend towards worse survival for those with a NLR ≥ 4, and it will be interesting to further explore the NLR in a larger NEC cohort to see whether this factor is a useful prognostic tool.

Among histological characteristics, and accordingly to other studies, there was no difference between small or large cell tumours in the present study[3,20–22]. The NORDIC study described the cut-off of 55% for Ki-67 as a prognosis factor for NEC[3], we therefore analysed OS accordingly and patients with a Ki-67 above 55% did have a shorter OS, but this difference was not significant. Primary tumour resection but not metastatic resection, was associated with better OS after univariate analysis and remains an option for the treatment of local NEC.

The limitations of this study are the ones that inherently apply to population data which are collected retrospectively. Multiple comparisons is a limit in this study. However, after Bonferroni adjustment, LDH and AST levels remained significant parameters ($p < 0.001$), whereas ECOG-PS and stage were not ($p = 0.02$). This study was performed on a small number of patients, due to the rarity of the disease and compared to other studies performed in multiple institutions. Biological data were not available for all patients, which decreases the power of the multivariate analysis. However, the median OS between the group of patients with all data available and the group with at least one missing data was similar. In addition, all patients were treated, and baseline characteristics presented were collected around the date of diagnosis (+/−2 weeks) before the beginning of any treatment. We therefore cannot study whether biomarkers (LDH, AST) are only prognostic factors or whether they are also predictive factors of response to systemic chemotherapy (platinum-etoposide), which was the standard first-line treatment. Nevertheless, an important strength of this study is that biological tests were performed in a single institution, and are therefore more homogeneous. It is also of note that this study is one of the largest performed in a single institution (109 patients over a 13-year period, which compares, for instance, to 100 patients with colorectal NEC who were reviewed over a 22-year period in a single centre and reported by Conte *et al.*[12].

In conclusion, we report herein that patients could be stratified into 3 groups according to a combination of LDH and AST levels which can help physicians to predict survival and to choose patients eligible for clinical trials. These results have to be confirmed in a larger independent population, in a multicentre setting, and ideally in a prospective study.

Patients and Methods

Population. Patients with NEC were identified from our neuroendocrine registry (ENETS centre of excellence), including gastroenteropancreatic and unknown location of primary tumours, and diagnosed between December 2002 and December 2015. The diagnosis of NEC was confirmed according to WHO 2010 classification with: i) a poorly differentiated carcinoma (small-cell or large-cell), ii) a grade 3 tumour (Ki-67 > 20% and/or mitotic index > 20 mitotic count per 10 high power field, HPF, (2 mm^2)), and iii) immunohistochemical detection of at least two neuroendocrine markers including CgA and synaptophysin[23]. All pathological specimens and/or pathological charts were reviewed by pathologists of the institution and only patients without doubt as to the diagnosis were included. There were no major differences in the previous and recent WHO classifications for the diagnosis of NEC, while few minor changes in the classification of well-differentiated NET were made during the revision of the WHO classification. Our database is registered and this cohort was approved by CNIL (*Commission nationale de l'informatique et des libertés*) on 6 November 2015 (no.15–111). All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. All patients signed an informed consent.

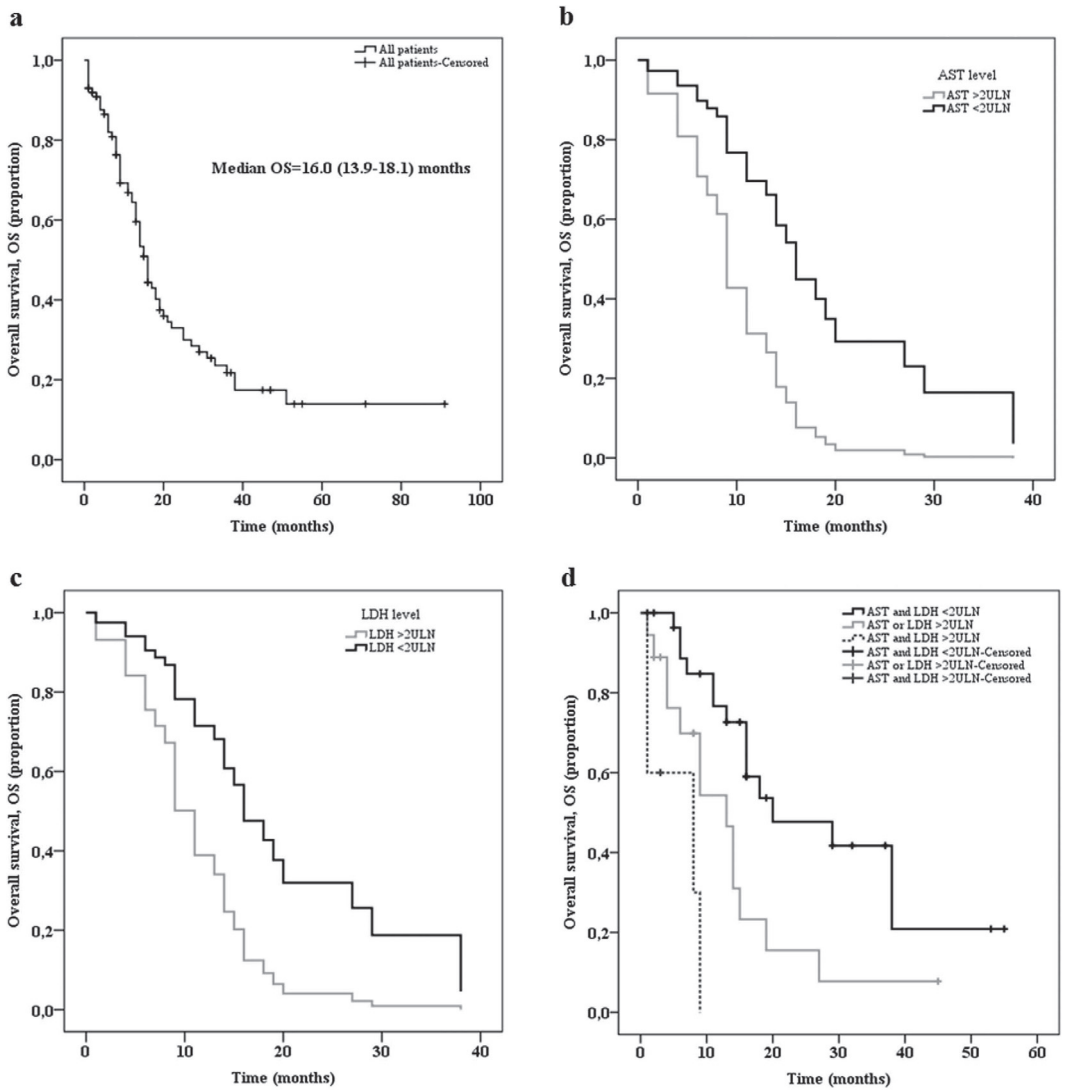


Figure 1. Overall survival (OS) among the population with GEP-NEC (**a**), and according to serum AST level (**b**), serum LDH level (**c**), and combining AST and LDH (**d**).

	Hazard ratio (95% CI)	*P* value
ECOG-PS, <2 vs. ≥ 2	0.82 (0.22–3.06)	0.77
Stage, I-III vs. IV	0.75 (0.25–2.27)	0.62
LDH, <2 ULN vs. ≥ 2 ULN	0.36 (0.13–0.97)	0.04
AST, <2 ULN vs. ≥ 2 ULN	0.31 (0.11–0.91)	0.03

Table 4. Multivariate Cox regression analysis of the prognosis factors in patients with GEP-NEC. Abbreviations: AST, aspartate aminotransferase; CI, confidence interval; ECOG-PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance status; LDH, lactate dehydrogenase; ULN, upper limit of normal.

Clinical, morphological and histological data. The following clinical features were recorded for all patients at diagnosis: age, gender, and presence or absence of symptoms within the 3 months before diagnosis of NEC. Weight loss was defined as the occurrence of a >5% decrease in weight within the 3 months before diagnosis. Morphological data collected included primary and metastatic locations, TNM stage, number of metastatic sites, uptake on somatostatin receptor scintigraphy (SRS, recorded as positive/negative) with indium-111-pentetreotide, and uptake on ^{18}F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET, recorded as positive/negative). Pathological data included cell size (small *versus* large), Ki-67 index, and presence of necrosis. Immunohistochemistry of CgA and synaptophysin were recorded as positive and negative. Evaluation of Ki-67 expression was performed in at least 2000 tumour cells, according to the current recommendations for GEP-NET[24]. Patients were followed (clinically with thoraco-abdomino-pelvic computed-tomography scan) every 2–3 months for 2 years after the diagnosis, then every 6 months.

Biological data. Biological data were collected in our laboratory at the time of diagnosis of NEC +/−2 weeks, and before the first treatment (chemotherapy): serum plasma levels of neuroendocrine markers CgA and NSE, LDH, liver functions tests (ALP, alanin aminotransferase – ALT, AST, total bilirubin), inflammatory markers (albumin, CRP, fibrinogen), haemostatic markers (PT, aPTT, haemoglobin – Hb, and platelets) and complete blood count (leukocytes, lymphocytes, neutrophils). The NLR was calculated and was considered high if NLR ≥ 3[7,8] or ≥ 4[25]. For all statistical analysis of biological data, we first analysed the median value as a cut-off. Based on the literature, CgA[4,23], NSE[4,23], and LDH[3,26] levels were considered high if they were 2 ULN. Thus, all the factors were examined as both continuous and categorical variables (2 ULN). Substrates used and technical changes for biochemical analysis during the study period are presented in Table S1.

Statistical analysis. Categorical variables were expressed as percentages and continuous variables were expressed as median with range. OS was calculated from the date of diagnosis to the date of death or last follow-up. OS were assessed using the Kaplan–Meier method and comparisons were performed using the log-rank test. For continuous variables, the chosen cut-off level chosen was their median value and we explored cut-offs described in the literature for Ki-67 (55%)[3], CgA (2 ULN)[3,4], NSE (2 ULN)[4,23], LDH (2 ULN)[3,4,26], and NLR (≥ 3 or ≥ 4)[7,8,25]. Only variables with a P value of < 0.05 according to univariate analysis were introduced in the Cox model. Relative risks were expressed as hazard ratios with 95% confidence intervals. A P value of < 0.05 was considered statistically significant. The cut-off date for the final analysis was 1 May 2016. All statistical analyses were performed using Statistical Package for Social Sciences version 17.0 (SPSS, Chicago, IL, US).

References

1. Yao, J. C. *et al.* One hundred years after 'carcinoid': epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J. Clin. Oncol.* **26,** 3063–3072 (2008).
2. Sorbye, H., Strosberg, J., Baudin, E., Klimstra, D. S. & Yao, J. C. Gastroenteropancreatic high-grade neuroendocrine carcinoma. *Cancer* **120,** 2814–2823 (2014).
3. Sorbye, H. *et al.* Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study. *Ann. Oncol.* **24,** 152–160 (2013).
4. Walter, T. *et al.* Characteristics, prognosis and treatments of 294 patients with poorly differentiated neuroendocrine carcinoma: The FFCD-GTE national cohort. *J. Clin. Oncol.* **33,** (suppl; abstr 4095) (2015).
5. Hermes, A., Gatzemeier, U., Waschki, B. & Reck, M. Lactate dehydrogenase as prognostic factor in limited and extensive disease stage small cell lung cancer - a retrospective single institution analysis. *Respir Med* **104,** 1937–1942 (2010).
6. Kang, E. J. *et al.* Prognostic Factors and Skeletal-Related Events in Patients with Small Cell Lung Cancer with Bone Metastases at the Time of Diagnosis. *Oncology* **90,** 103–111 (2016).
7. Grenader, T. *et al.* Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in advanced oesophago-gastric cancer: exploratory analysis of the REAL-2 trial. *Ann. Oncol.* **27,** 687–692 (2016).
8. McNamara, M. G. *et al.* Neutrophil/lymphocyte ratio as a prognostic factor in biliary tract cancer. *Eur. J. Cancer* **50,** 1581–1589 (2014).
9. Pavel, M. *et al.* NET Blood Transcript Analysis defines the Crossing of the Clinical Rubicon: When Stable Disease becomes Progressive. *Neuroendocrinology*, doi: 10.1159/000446025 (2016).
10. Modlin, I. M., Bodei, L. & Kidd, M. Neuroendocrine tumor biomarkers: From monoanalytes to transcripts and algorithms. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **30,** 59–77 (2016).
11. Yachida, S. *et al.* Small cell and large cell neuroendocrine carcinomas of the pancreas are genetically similar and distinct from well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* **36,** 173–184 (2012).
12. Conte, B. *et al.* High-Grade Neuroendocrine Colorectal Carcinomas: A Retrospective Study of 100 Patients. *Clin Colorectal Cancer* **15,** e1–7 (2016).
13. Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* **123,** 309–314 (1956).
14. Cros, J. & Couvelard, A. Contribution of angiogenesis and rationale for use of targeted therapies in digestive neuroendocrine tumours. *Cancéro dig.* **4,** 76–82 (2012).
15. Zhang, X. *et al.* Prognostic significance of serum LDH in small cell lung cancer: A systematic review with meta-analysis. *Cancer Biomark* **16,** 415–423 (2016).
16. Agrawal, A., Gandhe, M. B., Gupta, D. & Reddy, M. V. R. Preliminary Study on Serum Lactate Dehydrogenase (LDH)-Prognostic Biomarker in Carcinoma Breast. *J Clin Diagn Res* **10,** BC06–08 (2016).
17. Iyoda, A. *et al.* Clinical characterization of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma and large cell carcinoma with neuroendocrine morphology. *Cancer* **91,** 1992–2000 (2001).
18. Wiese, D. *et al.* C-Reactive Protein as a New Prognostic Factor for Survival in Patients With Pancreatic Neuroendocrine Neoplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101,** 937–944 (2016).
19. Zhou, T. *et al.* Ratio of C-Reactive Protein/Albumin is An Inflammatory Prognostic Score for Predicting Overall Survival of Patients with Small-cell Lung Cancer. *Sci Rep* **5,** 10481 (2015).
20. Shia, J. *et al.* Is nonsmall cell type high-grade neuroendocrine carcinoma of the tubular gastrointestinal tract a distinct disease entity? *Am. J. Surg. Pathol.* **32,** 719–731 (2008).
21. Maru, D. M. *et al.* Retrospective study of clinicopathologic features and prognosis of high-grade neuroendocrine carcinoma of the esophagus. *Am. J. Surg. Pathol.* **32,** 1404–1411 (2008).
22. Bernick, P. E. *et al.* Neuroendocrine carcinomas of the colon and rectum. *Dis. Colon Rectum* **47,** 163–169 (2004).
23. Baudin, E. *et al.* Neuron-specific enolase and chromogranin A as markers of neuroendocrine tumours. *Br. J. Cancer* **78,** 1102–1107 (1998).
24. Rindi, G. *et al.* TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch.* **449,** 395–401 (2006).
25. Zaragoza, J. *et al.* A high neutrophil-to-lymphocyte ratio as a potential marker of mortality in patients with Merkel cell carcinoma: A retrospective study. *J. Am. Acad. Dermatol.* **75,** 712–721.e1 (2016).
26. Brown, J. E., Cook, R. J., Lipton, A. & Coleman, R. E. Serum lactate dehydrogenase is prognostic for survival in patients with bone metastases from breast cancer: a retrospective analysis in bisphosphonate-treated patients. *Clin. Cancer Res.* **18,** 6348–6355 (2012).

Acknowledgements

We thank Dr Philip Robinson (DRCI, Hospices Civils de Lyon) for help in manuscript preparation.

Author Contributions

Conception and design: P.F., T.W.; collection and assembly of data: P.F., T.W., C.L., P.R., V.H.; data analysis, interpretation and manuscript writing: P.F., T.W.; and final approval for the manuscript: all authors.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at http://www.nature.com/srep

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Freis, P. *et al.* Prognostic factors in neuroendocrine carcinoma: biological markers are more useful than histomorphological markers. *Sci. Rep.* **7**, 40609; doi: 10.1038/srep40609 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

© The Author(s) 2017